

การสกัดและความคงตัวของไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลีนา

นายราเชนทร์ ดวงศรี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
ปีการศึกษา 2552

EXTRACTION AND STABILITY OF PHYCOCYANIN
FROM *Spirulina* sp.

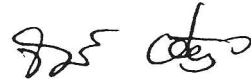
Rachen Duangsi

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Degree of Master of Science in Food Technology
Suranaree University of Technology
Academic Year 2009

การสกัดและความคงตัวของไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลินา

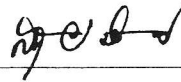
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



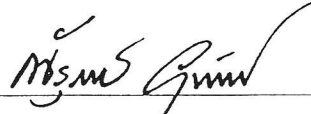
(รศ. ดร.จิรวัดน์ ยงสวัสดิกุล)

ประธานกรรมการ



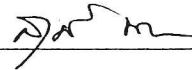
(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)



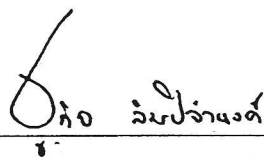
(นายณัฐภาส ผู้พัฒน์)

กรรมการ



(ผศ. ดร.สุนันทา ทองทา)

กรรมการ



(ศ. ดร.ชุกิจ ลิ้มปิจำนงค์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ



(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ราเชนทร์ ดวงศรี : การสกัดและความคงตัวของไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลินา

(EXTRACTION AND STABILITY OF PHYCOCYANIN FROM *Spirulina* sp.)

อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์, 125 หน้า.

งานวิจัยนี้ ได้คัดเลือกสาหร่ายในสกุลสไปรูลินาจากสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ 10 สายพันธุ์ ได้แก่ *Spirulina platensis* (IFRPD1178 1181 1190 1204 1208 1212 1213 และ 1216) และ *Spirulina maxima* (IFRPD1183 และ 1215) เพื่อค้นหาสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการนำไปสกัดสารไฟโคไซยานิน โดยพิจารณาจากลักษณะทั่วไปของเซลล์สาหร่าย ปริมาณไฟโคไซยานินทั้งหมด และผลผลิตของไฟโคไซยานินที่สกัดได้ จากการศึกษาพบว่า ทุกสายพันธุ์มีอัตราการเติบโตไม่แตกต่างกัน แต่สายพันธุ์ 1183 และ 1213 ได้รับการคัดเลือกเพื่อนำไปสกัดไฟโคไซยานิน เนื่องจากมีปริมาณไฟโคไซยานินสูง (ร้อยละ 17.53 และ 17.14 ของน้ำหนักแห้งตามลำดับ) ไม่แยกตัวจากอาหารที่ใช้เลี้ยง และผนังเซลล์ของสาหร่ายทั้งสองสายพันธุ์ทนต่อแรงกลระหว่างการเก็บเกี่ยวได้ดี การศึกษาวิธีการสกัดไฟโคไซยานินทำโดยใช้วิธีการทำลายผนังเซลล์ 3 วิธี คือ (1) วิธีการใช้คลื่นอัลตราโซนิก (2) วิธีการแช่เยือกแข็งสลับกับการละลาย (Repeatedly freezing and thawing, RFT) และ (3) การย่อยด้วยไลโซไซม์ เพื่อสกัดไฟโคไซยานิน โดยที่วิธีที่ (1) ทำลายผนังเซลล์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกเป็นเวลา 5, 12.5 และ 20 วินาที ที่ระดับความสูงของคลื่นร้อยละ 70, 85 และ 100 ส่วนวิธีที่ (2) ใช้การแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 1-3 ชั่วโมง สลับกับการละลาย 1-3 รอบ และในวิธีที่ (3) ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 9.09 และ 18.17 มิลลิกรัมต่อกรัมของสาหร่ายแห้ง โดยการสกัดที่อุณหภูมิ 30 37 และ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-4 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่า คลื่นอัลตราโซนิกสามารถทำลายผนังเซลล์สาหร่ายทั้งสองสายพันธุ์ได้ดีกว่าวิธี RFT หลังจากทำลายผนังเซลล์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกเมื่อนำไปสกัดต่อพบว่าที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลาสกัดมีผลต่อประสิทธิภาพการสกัด (Extraction efficiency, EE) ของทั้งสองสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ค่า EE ของทั้งสองสายพันธุ์ที่อุณหภูมิเท่ากันไม่แตกต่างกัน การสกัดสายพันธุ์ 1183 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะให้ค่า EE สูงกว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากการสกัดโดยใช้เอนไซม์ พบว่าระยะเวลาและอุณหภูมิในการสกัด มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดไฟโคไซยานินและการปนเปื้อนของคลอโรฟิลล์ในสารละลายไฟโคไซยานินอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ปริมาณไลโซไซม์ มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดของสายพันธุ์ 1213 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ไม่มีผลต่อสายพันธุ์ 1183 และพบว่าตัวอย่างที่สกัดโดยใช้เอนไซม์จะให้ค่า EE สูงกว่าเมื่อสกัดด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพียงอย่างเดียวเพียงร้อยละ 6.4 สำหรับสายพันธุ์ 1213 และการสกัดโดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพียงอย่างเดียวที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงกว่าการสกัดด้วยน้ำอาร์โอ

ถึง 13 เท่า

การศึกษาผลของพีเอชและความร้อนที่มีต่อความคงตัวของไฟโคไซยานินที่สกัดได้จากสาหร่าย *Spirulina maxima* IFRPD1183 โดยทำในสารละลายซีเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีไฟโคไซยานินเข้มข้น 123 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยบัฟเฟอร์มีค่าความเข้มข้นของประจุ (Ionic strength) 0.1 โมลต่อลิตร และปรับพีเอช เป็น 3.0 4.0 4.5 5.0 และ 6.0 พบว่าที่พีเอชต่างๆ ไฟโคไซยานินจะยังคงสภาพทางธรรมชาติได้ที่พีเอชสูงกว่าหรือเท่ากับ 5.0 ส่วนผลการให้ความร้อนอย่างต่อเนื่อง จาก 30 องศาเซลเซียส ถึง 68 องศาเซลเซียส ในเวลา 240 วินาที พบว่าสารละลายไฟโคไซยานินที่พีเอช 5.0 มีความคงตัวต่อความร้อนมากที่สุด


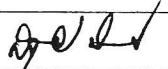
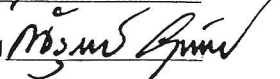
การศึกษาผลของมอลโตเดกซ์ตริน กลีเซอรอลและมอลติตอล ที่มีต่อความคงตัวของไฟโคไซยานินที่สกัดได้จากสาหร่าย *Spirulina maxima* IFRPD1183 ที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยและแบบแช่เยือกแข็งระเหิดแห้ง พบว่าไฟโคไซยานินที่ไม่มีสารให้ความคงตัวเมื่อผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยและแบบแช่เยือกแข็งระเหิดแห้ง จะสูญเสียความคงตัวเมื่อพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงของ A620/A370 คิดเป็นร้อยละ 31.5 และ 5.5 ตามลำดับ การเติมกลีเซอรอลมากกว่า 0.3 กรัมต่อกรัมโปรตีนจะลดความคงตัวของไฟโคไซยานินในระหว่างกระบวนการทำแห้ง ความคงตัวของไฟโคไซยานินที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยและแบบแช่เยือกแข็งระเหิดแห้งจะลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณมอลโตเดกซ์ตริน แต่ไฟโคไซยานินที่ทำแห้งแบบพ่นฝอยจะมีความคงตัวมากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณมอลติตอล

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของไฟโคไซยานินผงที่ได้จากการทำแห้งโดยใช้ความร้อนแบบพ่นฝอย ซึ่งมีมอลโตเดกซ์ตริน และมอลติตอลเป็นสารให้ความคงตัวในอัตรา 2 กรัม และ 1 กรัมต่อกรัมโปรตีนตามลำดับ เมื่อเก็บไฟโคไซยานินผงในสภาวะมีอากาศ และในสภาวะเป็นสุญญากาศ ร้อยละ 80 ที่อุณหภูมิ 35 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าบรรยากาศในการเก็บรักษาไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า A620/A370 ของไฟโคไซยานิน แต่การเปลี่ยนแปลงของค่าดังกล่าว ที่อุณหภูมิทั้งสองจะลดลงตามระยะเวลาการเก็บและเป็นปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงอันดับที่ 1 ซึ่งมีค่าอัตราคงที่เท่ากับ -9×10^{-4} และ -13×10^{-4} ที่อุณหภูมิ 35 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

เมื่อศึกษาผลของไฟโคไซยานินต่อดัชนีความคงตัวของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ พบว่าไฟโคไซยานินผงที่ทำแห้งด้วยความร้อนไม่มีผลต่อดัชนีความคงตัวของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ อย่างไรก็ตาม ไฟโคไซยานินผงที่ไม่มีสารให้ความคงตัวจะมีประสิทธิภาพในการเพิ่มความคงตัวของน้ำมันมะพร้าวได้ต่ำกว่าไฟโคไซยานินผงที่มีมอลโตเดกซ์ตรินและมอลติตอลเป็นสารให้ความคงตัวอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) และจากการศึกษาความสามารถในการจับอนุมูลไฮดรอกซิล และ

อนุมูลของเหล็ก พบว่า ไฟโคไซยานินที่มีการสูญเสียสภาพธรรมชาติมากกว่าจะจับอนุมูลไฮดรอกซิลได้มากกว่า ตรงข้ามกับความสามารถในการจับอนุมูลของเหล็กซึ่งจะลดน้อยลง

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
ปีการศึกษา 2552

ลายมือชื่อนักศึกษา 
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา 
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม 

RACHEN DUANGSI : EXTRACTION AND STABILITY OF
PHYCOCYANIN FROM *Spirulina* sp. THESIS ADVISOR : ASST. PROF.
SUWAYD NINGSANOND, Ph.D., 125 PP.

PHYCOCYANIN/ *SPIRULINA* EXTRACTS/ DRYING/ MALTODEXTRIN/
MALTITOL/ GLYCEROL/ ANTIOXIDANT

This research selected suitable *Spirulina* from 10 strains of *Spirulina platensis* (IFRPD1178, 1181, 1190, 1204, 1208, 1212, 1213, and 1216) and *Spirulina maxima* (IFRPD1183 and 1215) from the collection of the Institute of Food Research and Product Development, Kasetsart University for phycocyanin extraction. Selection criteria were based on their morphological properties, phycocyanin contents and extracted yields. The results showed that their growth rates were not different. However, IFRPD1183 and 1213 were selected for phycocyanin extraction because of their high phycocyanin contents (17.53 and 17.14%, respectively), good cell suspension in culturing media and adequate cell wall resistance to mechanical rupture during harvesting.

Three methods of cell wall breakages for phycocyanin extraction were conducted; (1) sonication, (2) repeatedly freezing and thawing (RFT), and (3) enzymolysis with lysozyme. Ultrasonic waves were employed for sonication for 5, 12.5 and 20 sec at 70, 85 and 100% amplitudes. Freezing at -20°C for 1 – 3 h with 1 to 3 thawing cycles were carried out for RFT. For enzymolysis, 9.09 and 18.17 mg lysozyme per g of algae dry weight at 30, 37 and 44°C for 1 – 4 h were studied. The results showed that sonication offered higher cell wall ruptures than RFT method.

After cell wall rupture by sonication, *Spirulina* phycocyanin was extracted at 25 and 37°C. It was found that extraction time significantly affected the extraction efficiency (EE) of both strains ($p < 0.05$), but extraction temperature did not. The EE value of IFRPD1183 extracted at 37°C was higher than that at 25°C. From enzymolysis, the extraction time and extraction temperature significantly affected EE and chlorophyll contamination of crude phycocyanin ($p < 0.05$). Lysozyme concentration was the only factor affecting phycocyanin extraction from IFRPD1213, with no effect on IFRPD1183. The EE of phycocyanin from IFRPD1213 using lysozyme was only 6.4% higher than that using only sodium phosphate buffer solution (0.1 M pH 7.0). The extraction phycocyanins at 37°C using only buffer solution also provided 13 fold EE higher than using RO water.

Effects of pH and heat on crude PC solution (0.123 $\mu\text{g/ml}$) from IFRPD1183 were determined in citrate-phosphate buffer with an ionic strength of 0.1 M at pH of 3.0, 4.0 4.5 5.0 and 6.0. Results showed that PC retained its native conformation at a $\text{pH} \geq 5.0$. Effects of heat under continuous heating from 30°C to 68°C in 240 seconds at each pH showed that PC exhibited the highest stability at pH 5.0.

Phycocyanin from IFRPD1183 was dried with and without maltodextrin glycerol and maltitol using spray drying and freeze drying. Results showed that phycocyanin without stabilizers treated by spray drying and by freeze drying lost its stability in term of A_{620}/A_{370} changes at 31.5 and 5.5%, respectively. Phycocyanin loss increased with increased maltodextrin and glycerol, but this loss was decreased with increased maltitol.

Stability of dried phycocyanin with maltodextrin 2 g/g protein and maltitol 1 g/g protein in term of A_{620}/A_{370} changes was studied during keeping at 35 and

45°C under air and 80% vacuum. Results showed that storage under air/vacuum packing had no effect on A620/A370 changes. Changes of A620/A370 of stored phycocyanin followed the first order reaction with the rate constant of $-9 \times 10^{-4}/h$ and $13 \times 10^{-4}/h$ at 35 and 45°C, respectively.

Effects of thermally dried phycocyanin on oil stability index (OSI) of virgin coconut oil in term of induction time at 150°C were determined. Results showed that dried phycocyanin had no effect on OSI of virgin coconut oil. However, dried phycocyanin with stabilizers (maltodextrin and maltitol) significantly increased OSI of virgin coconut oil higher than dried phycocyanin without stabilizer ($p < 0.05$). OH scavenging activity and iron chelating capacity of phycocyanin were studied. Results showed that high degree of denaturation of dried phycocyanin offered high OH scavenging activity, but it provided opposite results for iron radical chelating capacity.

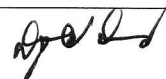
School of Food Technology

Academic Year 2009

Student's Signature



Advisor's Signature



Co-advisor's Signature



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี เนื่องจากได้รับความช่วยเหลืออย่างยิ่ง ทั้งด้านวิชาการ และด้านการดำเนินงานวิจัย จากบุคคลและกลุ่มบุคคลต่าง ๆ ได้แก่

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์) และอาจารย์ ญัฐภาส ผู้พัฒนา จากสถาบันคั่นคว่ำและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม) ที่กรุณาให้คำปรึกษาด้านวิชาการและการแก้ปัญหาอุปสรรคในด้านต่างๆ

นายประเสริฐ อวนศรี (เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงสาหร่าย สถาบันคั่นคว่ำ และพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์)

นักวิทยาศาสตร์อาคารเครื่องมือ 1 2 และ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ตลอดจนเพื่อน ร่วมเรียนระดับบัณฑิตศึกษาที่ให้อำลักำลังใจ และให้ข้อเสนอแนะและความช่วยเหลือในด้านต่างๆ มาโดยตลอด

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ภายใต้โครงการทุนวิจัยมหาบัณฑิต ที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิจัย

สำหรับความความดีอันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ผู้วิจัยขอมอบให้กับบิดา มารดา ซึ่งเป็นที่รักและเคารพยิ่ง ตลอดจนครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และถ่ายทอดประสบการณ์ที่ดีให้แก่ผู้วิจัยตลอดมา จนทำให้ประสบความสำเร็จในชีวิต

ราชนนท์ ดวงศรี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ง
กิตติกรรมประกาศ.....	ข
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ค
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ด
บทที่	
1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	1
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
1.4 คำอธิบายศัพท์.....	2
2 ปรัชญ่วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 สาหร่ายสาไปรูไลนา.....	3
2.2 ไฟโคไบลิโชม.....	6
2.3 การเขียนชื่อไฟโคไซยานิน.....	8
2.4 โมเลกุลของไฟโคไซยานิน.....	9
2.5 คุณสมบัติของไฟโคไซยานิน.....	13
2.6 คุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของไฟโคไซยานิน.....	14
2.7 ไฟโคไซยานินที่ผลิตเป็นการค้า.....	15
2.8 การสกัดไฟโคไซยานิน.....	15
2.9 การสกัดไฟโคไซยานินด้วยการแช่เยือกแข็งสลับกับการละลาย คลื่นอัลตราโซนิก และไลโซไซม์.....	18

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.10	การสูญเสียสภาพทางธรรมชาติและความคงตัวของไฟโคไซยานิน.....	19
2.11	สารเพิ่มความคงตัวสำหรับการทำแห้งไฟโคไซยานิน.....	20
2.12	การศึกษาคุณสมบัติของไฟโคไซยานิน.....	21
2.12.1	การศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารต้านการเกิดอนุมูลอิสระ.....	21
2.12.2	การคำนวณความเข้มข้นของไฟโคไซยานิน.....	22
2.12.3	การคำนวณค่าความบริสุทธิ์ของไฟโคไซยานิน.....	22
2.12.4	การศึกษาความคงตัวของไฟโคไซยานิน.....	23
2.13	รายการอ้างอิง.....	23
3	การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายสีไปรุไลนาสำหรับการสกัดไฟโคไซยานิน.....	29
3.1	บทคัดย่อ.....	29
3.2	บทนำ.....	29
3.3	วิธีดำเนินการวิจัย.....	30
3.3.1	การเพาะเลี้ยงสาหร่าย.....	30
3.3.2	สารเคมี.....	31
3.3.3	การศึกษาขนาดและรูปร่างสาหร่าย.....	31
3.3.4	การสกัดไฟโคไซยานินเพื่อหาปริมาณไฟโคไซยานินทั้งหมด.....	31
3.3.5	ผลผลิตของไฟโคไซยานิน.....	32
3.3.5.1	การสกัดด้วยวิธีการแช่เยือกแข็งสลับกับการละลาย.....	32
3.3.5.2	การสกัดโดยใช้คลื่นอัลตราโซนิก.....	32
3.3.6	สถิติและแผนการทดลอง.....	32
3.4	ผลการทดลองและการอภิปรายผล.....	33
3.4.1	ลักษณะทั่วไปของสาหร่ายสีไปรุไลนา.....	33
3.4.2	มิติของเซลล์สาหร่าย.....	34
3.4.3	อัตราการเจริญเติบโตและผลผลิต.....	34
3.4.4	ความสามารถในการสกัดไฟโคไซยานิน.....	34
3.4.5	คุณสมบัติของไฟโคไซยานิน.....	36

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.5	สรุปผลการวิจัย.....	37
3.6	รายการอ้างอิง.....	38
4	การศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลีนา.....	40
4.1	บทคัดย่อ.....	40
4.2	บทนำ.....	40
4.3	วิธีดำเนินการวิจัย.....	41
4.3.1	สารเคมีและเอนไซม์.....	41
4.3.2	พันธุ์สาหร่ายสไปรูลีนา.....	42
4.3.3	การสกัดไฟโคไซยานินเพื่อหาปริมาณไฟโคไซยานินทั้งหมด.....	42
4.3.4	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสกัดไฟโคไซยานิน.....	43
4.3.4.1	การทำลายผนังเซลล์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก.....	43
4.3.4.2	การทำลายผนังเซลล์ด้วยวิธี RFT.....	43
4.3.4.3	การสกัดต่อเนื่องหลังทำลายผนังเซลล์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก.....	43
4.3.4.4	การสกัดด้วยไลโซไซม์.....	44
4.4	ผลการทดลองและอภิปรายผล.....	44
4.4.1	ผลของคลื่นอัลตราโซนิกและ RFT ต่อการทำลายผนังเซลล์ของสาหร่าย.....	44
4.4.2	ผลจากการสกัดด้วยไลโซไซม์.....	50
4.5	สรุปผลการวิจัย.....	53
4.6	รายการอ้างอิง.....	53
5	การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายสไปรูลีนาสำหรับการสกัดไฟโคไซยานิน.....	55
5.1	บทคัดย่อ.....	55
5.2	บทนำ.....	55
5.3	วิธีดำเนินการวิจัย.....	56
5.3.1	วัตถุดิบและสารเคมี.....	56
5.3.2	วิธีเตรียมตัวอย่างสารละลายไฟโคไซยานิน.....	56
5.3.3	การศึกษาผลของค่าพีเอชต่อการจัดเรียงโมเลกุลของไฟโคไซยานินในสารละลาย.....	57

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5.3.4	การศึกษาผลของความร้อนและพีเอชต่อการจัดเรียงโมเลกุลของไฟโคไซยานิน.....	57
5.4	ผลการทดลองและอภิปรายผล.....	57
5.4.1	ผลของพีเอช.....	57
5.4.2	ผลของความร้อนและพีเอช.....	62
5.5	สรุปผลการวิจัย.....	65
5.6	รายการอ้างอิง.....	65
6	ผลของมอลโตเดกซ์ตริน กลีเซอรอลและมอลติตอล ต่อความคงตัวของไฟโคไซยานิน ที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอย.....	67
6.1	บทคัดย่อ.....	67
6.2	บทนำ.....	67
6.3	วิธีดำเนินการวิจัย.....	68
6.3.1	วัตถุดิบและสารเคมี.....	68
6.3.2	วิธีเตรียมตัวอย่างสารละลายไฟโคไซยานิน.....	69
6.3.3	การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาผลของมอลโตเดกซ์ตริน กลีเซอรอล และมอลติตอล.....	69
6.3.3.1	การศึกษาผลของกลีเซอรอลและมอลติตอล.....	69
6.3.3.2	การศึกษาผลของมอลโตเดกซ์ตรินและมอลติตอล.....	70
6.3.4	การทำแห้ง.....	71
6.3.4.1	การทำแห้งแบบพ่นฝอย.....	71
6.3.4.2	การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งระเหิดแห้ง.....	71
6.3.5	การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของตัวอย่างหลังการทำแห้ง.....	72
6.4	ผลการทดลองและอภิปรายผล.....	72
6.4.1	ผลของกลีเซอรอลและมอลติตอลต่อความคงตัวของไฟโคไซยานิน ทำแห้งแบบพ่นฝอย.....	72
6.4.2	ผลของมอลโตเดกซ์ตรินและมอลติตอลต่อความคงตัวของ ไฟโคไซยานินทำแห้งแบบพ่นฝอย.....	73

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

6.4.3	ผลของมอลโตเดกซ์ทรินและมอลติตอลต่อไฟโคไซยานินทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งระเหิดแห้ง.....	75
6.5	สรุปผลการวิจัย.....	76
6.6	รายการอ้างอิง.....	77
7	ผลของสภาวะการเก็บรักษาที่มีต่อความคงตัวของไฟโคไซยานินผง และความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ.....	79
7.1	บทคัดย่อ.....	79
7.2	บทนำ.....	79
7.3	วิธีดำเนินการวิจัย.....	80
7.3.1	วัตถุดิบและสารเคมี.....	80
7.3.2	วิธีเตรียมตัวอย่างสารละลายไฟโคไซยานิน.....	80
7.3.3	การเตรียมตัวอย่างเพื่อการทำแห้ง.....	80
7.3.4	การทำแห้ง.....	80
7.3.5	การศึกษาผลของสภาวะการเก็บรักษา.....	81
7.3.6	การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของไฟโคไซยานินระหว่างการเก็บรักษา.....	81
7.3.7	การศึกษาผลของไฟโคไซยานินต่อความคงตัวของน้ำมัน.....	81
7.3.8	การเกิดอันตรกิริยาระหว่างไฟโคไซยานินกับอนุมูลไฮดรอกซี (Interaction of Phycocyanin with Hydroxyl Radicals).....	82
7.3.9	การศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูลของเหล็ก (Iron-chelating assay).....	82
7.4	ผลการทดลองและอภิปรายผล.....	82
7.4.1	ผลของสภาวะการเก็บรักษา.....	82
7.4.2	ผลของไฟโคไซยานินต่อดัชนีความคงตัวของน้ำมัน.....	84
7.4.3	ความสามารถในการจับอนุมูลไฮดรอกซิลของไฟโคไซยานิน.....	86
7.4.4	ความสามารถของไฟโคไซยานินในการจับอนุมูลของเหล็ก.....	87

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

7.5	สรุปผลการวิจัย.....	89
7.6	รายการอ้างอิง.....	90
8	บทสรุปและข้อเสนอแนะ.....	91
8.1	การสกัดไฟโคไซยานิน.....	91
8.2	การทำแห้งไฟโคไซยานิน.....	92
8.3	ผลของสภาวะการเก็บรักษาที่มีต่อความคงตัวของสารประกอบ ไฟโคไซยานินผง.....	92
ภาคผนวก		
ภาคผนวก ก	สูตรอาหาร Zarrouk.....	94
ภาคผนวก ข	วิเคราะห์ความแปรปรวนของงานวิจัยบทที่ 4.....	97
ภาคผนวก ค	วิธีการสร้างกราฟอนุพันธ์อันดับหนึ่ง.....	112
ภาคผนวก ง	ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนของงานวิจัยบทที่ 6.....	115
ภาคผนวก จ	คำนวณสมการอัตราของการเปลี่ยนแปลงค่า A620/A370 ของ ไฟโคไซยานินเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 35 และ 45 องศาเซลเซียส.....	121
ประวัติผู้เขียน.....		125

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 ไวตามินที่พบในสาหร่ายสไปรูลินาผง	5
2.2 องค์ประกอบทางเคมีของสาหร่าย <i>S. platensis</i> และ <i>S. maxima</i>	6
2.3 กรดไขมันที่พบในสาหร่าย <i>S. platensis</i>	6
2.4 แร่ธาตุที่พบในสาหร่ายสไปรูลินาผง	6
2.6 จำนวนพันธะคู่แบบคอนจูเกตบนโมเลกุลของไบลินแต่ละชนิด ที่พบ ในสาหร่ายในกลุ่มไซยาโนแบคทีเรีย	8
2.7 จำนวนไบลินต่อโมโนเมอร์ของไบลิโพรตีน	9
2.8 คุณสมบัติการดูดกลืนแสงและการเรืองแสงของไฟโคไซยานินจากสาหร่ายชนิดต่างๆ	13
2.9 น้ำหนักโมเลกุลของ C-Phycocyanin จากสาหร่ายในกลุ่มไซยาโนแบคทีเรีย.....	14
2.10 ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของ C-PC เมื่ออยู่ในรูปต่างๆ	14
2.11 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนจากเซลล์ของสาหร่าย <i>Mycobacterium smegmatis</i> ด้วยวิธีต่างๆ กัน	19
3.1 มติของเซลล์สาหร่ายสไปรูลินา.....	35
3.2 อัตราเจริญเติบโตและผลผลิตของสาหร่ายสไปรูลินา.....	35
3.3 ไฟโคไซยานินที่สกัดได้เป็นร้อยละของไฟโคไซยานินทั้งหมด	36
3.4 ค่าความบริสุทธิ์ของไฟโคไซยานินที่สกัดได้จากสาหร่ายสไปรูลินา 10 สายพันธุ์.....	36
3.5 ความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายไฟโคไซยานินที่สกัดได้	37
4.1 ค่าประสิทธิภาพการสกัดเมื่อทำลายผนังเซลล์ด้วยวิธีการใช้คลื่นอัลตราโซนิกและ RFT.....	45
4.2 ประสิทธิภาพการสกัดไฟโคไซยานินด้วยไลโซไซม์.....	52
4.3 ประสิทธิภาพในการสกัดไฟโคไซยานินจากสายพันธุ์ 1213 ที่ 37 องศาเซลเซียส โดยไม่ใช้ไลโซไซม์.....	52
5.1 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไฟโคไซยานินโดยผลของพีเอช.....	60
5.2 อัตราการเปลี่ยนแปลงค่าอัตราส่วน A617/A370 ก่อนและหลังให้ความร้อน ที่ระดับพีเอชแตกต่างกัน.....	63

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
5.3 การเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงของไฟโคไซยานินก่อนและหลังให้ความร้อน ที่ระดับพีเอชแตกต่างกัน.....	64
6.1 แผนการทดลองเพื่อศึกษาผลของกลีเซอรอลและมอลติตอล.....	70
6.2 แผนการทดลองเพื่อศึกษาผลของมอลโตเดกซ์ทรินและมอลติตอล.....	71
6.3 ค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงของ A620/A370 ของตัวอย่างควบคุม.....	75
7.1 ผลของไฟโคไซยานินต่อค่าดัชนีความคงตัวของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส.....	85
7.2 การเปลี่ยนแปลงของไฟโคไซยานินเมื่อทำปฏิกิริยากับอนุมูลไฮดรอกซิล.....	87

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 โครงร่างสาหร่าย <i>S. platensis</i> จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด	4
2.2 โครงสร้างผนังเซลล์ของ <i>S. platensis</i> จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน แบบส่องผ่าน	4
2.3 ผลการศึกษา Sedimentation velocity ของไฟโคไซยานินจากสาหร่าย <i>Lyngbya</i> sp.....	12
2.4 โครงสร้างภายในของสาหร่าย <i>S. maxim</i>	16
3.1 ไตรโคมของสาหร่ายสไปรูลีนา (กำลังขยาย 20 เท่า) และเซลล์ของสาหร่ายสไปรูลีนา จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน	33

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1 แบบจำลองโครงสร้างผนังเซลล์ของ <i>S. platensis</i>	5
2.2 แบบจำลองการจัดเรียงตัวของไฟโคไลโซม; ภาพบนแสดงการเชื่อมต่อระหว่างไฟโคไลโซมกับเยื่อหุ้มไทลาคอยด์.....	7
2.3 โครงสร้างของไฟโคไซยานินไบลิน	8
2.4 ตำแหน่งการเกิดพันธะโควาเลนต์ระหว่างไบลินกับอะโปโปรตีนของ C-phyococyanin.....	9
2.5 โครงสร้างการจัดเรียงโมเลกุลของไฟโคไซยานินโมโนเมอร์	10
2.6 ยูนิตเซลล์ (Unit cell) ของไฟโคไซยานิน 612	11
2.7 อัตราการรวมตัวของไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสายพันธุ์ <i>Lynnbya</i> sp. ที่ความเข้มข้นของไฟโคไซยานินต่างๆ กันในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.0 ณ อุณหภูมิห้อง	12
4.1 ผลตอบสนองเชิงพื้นที่ผิวของคลื่นอัลตราโซนิกต่อการทำลายผนังเซลล์โดยประเมินจากประสิทธิภาพการสกัด	46
4.2 ผลตอบสนองเชิงพื้นที่ผิวของวิธี RFT ต่อการทำลายผนังเซลล์ โดยประเมินจากประสิทธิภาพการสกัด	47
4.3 ผลตอบสนองเชิงพื้นที่ผิวของคลื่นอัลตราโซนิกต่อการปนเปื้อนของคลอโรฟิลล์โดยประเมินจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร.....	48
4.4 ค่าการดูดกลืนแสงที่แสดงการปนเปื้อนของคลอโรฟิลล์ในสารละลาย ไฟโคไซยานินที่ได้จากการทำลายผนังเซลล์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก ที่ค่าความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร	49
4.5 ค่า EE ของการสกัดไฟโคไซยานินจากสายพันธุ์ 1183 และ 1213 โดยผลของระยะเวลาสกัด	49
4.6 ผลตอบสนองเชิงพื้นที่ผิวของค่า EE ของไฟโคไซยานินจากสายพันธุ์ 1183 โดยผลของอุณหภูมิและค่า Et.....	50
4.7 ผลตอบสนองเชิงพื้นที่ผิวของค่า EE ของไฟโคไซยานินจากสายพันธุ์ 1213.....	51
5.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายไฟโคไซยานินที่พีเอช 3.0 – 6.0 อุณหภูมิ 28±2 องศาเซลเซียส	58

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
5.2 แผนภาพอนุพัทธ์ระดับที่ 1 ของค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายไฟโคไซยานิน : เปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังปั่นเหวี่ยงที่พีเอช 4.0 และ 4.5 กับตัวอย่างที่พีเอช 3.0 และ 5.0 ซึ่งไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยง.....	59
5.3 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายไฟโคไซยานิน : เปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างที่พีเอช 3.0 4.0 และ 4.5 หลังการปั่นเหวี่ยง กับตัวอย่างที่พีเอช 5.0 ซึ่งไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยง.....	59
5.4 ค่าความเข้มการเรืองแสงแสงของสารละลายไฟโคไซยานิน ที่ $\lambda_{ex} = 590$ นาโนเมตร ที่พีเอชต่างๆ กัน	61
5.5 การเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงของไฟโคไซยานินที่ความยาวคลื่น 620 และ 370 นาโนเมตร และการเปลี่ยนแปลงค่า A620/A370 ระหว่างการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ เพิ่มอย่างต่อเนื่องจาก 30-68 องศาเซลเซียส.....	63
6.1 ผลตอบสนองเชิงพื้นที่ผิวของความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงของ A620/A370 ปริมาณกลีเซอรอล และปริมาณมอลติตอล ของไฟโคไซยานินที่ทำแห้ง แบบพ่นฝอย.....	73
6.2 ผลตอบสนองเชิงพื้นที่ผิวของความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงของ A620/A370 ปริมาณมอลโตเดกซ์ตริน และปริมาณมอลติตอลของไฟโคไซยานิน ที่ทำแห้งแบบพ่นฝอย	74
6.3 ผลตอบสนองเชิงพื้นที่ผิวของความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงของ A620/A370 ปริมาณมอลโตเดกซ์ตริน และปริมาณมอลติตอลของไฟโคไซยานิน ที่ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งระเหิดแห้ง	76
7.1 การเปลี่ยนแปลงค่าอัตราส่วน A620/A370 ของไฟโคไซยานินผงเมื่อเก็บในสถานะ มีอากาศและเป็นสุญญากาศร้อยละ 80 ที่อุณหภูมิ 35 และ 45 องศาเซลเซียส.....	83
7.2 สมการอัตราของการเปลี่ยนแปลงค่าอัตราส่วน A620/A370 ของไฟโคไซยานินผงเมื่อเก็บ ในสถานะมีอากาศและเป็นสุญญากาศร้อยละ 80 ที่อุณหภูมิ 35 และ 45 องศาเซลเซียส	83
7.3 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายไฟโคไซยานินเมื่อทำปฏิกิริยากับอนุมูลของเหล็ก ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน	88
7.4 ความสามารถของไฟโคไซยานินในการกำจัดไอออนของเหล็ก.....	89

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

A280	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร
A370	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร
A620	=	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร
EDTA	=	สารอีดีทีเอ (Ethylene diamine tetraacetate)
k	=	ค่าคงที่อัตรา (Rate constant)
LPS	=	ไลโปพอลิแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide)
PC	=	ไฟโคไซยานิน (Phycocyanin)
PCB	=	ไฟโคไซยานโนไบลิน (Phycocyanobilin)
Q_{10}	=	อัตราส่วนของค่าคงที่อัตรา เมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนไป 10 องศาเซลเซียส
RCF	=	Relative centrifugal force
RFT	=	การแช่เยือกแข็งสลับกับการละลาย (Repeated freezing and thawing)
TBA	=	Thiobarbituric acid
T_g	=	ค่าอุณหภูมิการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว (Glass transition Temperature)
T_{in}	=	อุณหภูมิความร้อนขาเข้า
T_{out}	=	อุณหภูมิความร้อนขาออก
λ_{max}	=	ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (Maximum lambda)
z value	=	ค่าองศาของอุณหภูมิที่เปลี่ยนไปแล้วทำให้ค่าคงที่อัตราเปลี่ยนไป 10 เท่า

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ไฟโคไซยานิน (Phycocyanin : PC) เป็นสารประกอบประเภทโปรตีนที่มีรงควัตถุ (Chromophore) เกาะอยู่บนโมเลกุล พบได้ทั่วไปในสาหร่ายในคลาส *Cyanophyceae* แต่โดยทั่วไปสกัดจากสาหร่ายสไปรูลินา (*Spirulina* sp.) เป็นสารที่มีสีฟ้า เรืองแสงได้ และละลายได้ดีในน้ำ มีคุณสมบัติเป็นสารเพื่อโภชนะบำบัด (Nutraceutical) และมีมูลค่าสูง ในปัจจุบันไฟโคไซยานินถูกใช้เป็นสีผสมอาหาร และใช้เป็นตัวชี้วัด (Marker) ในการตรวจสอบทางภูมิคุ้มกันวิทยา (Immunology Diagnostic Applications) ในทางการค้ามีการผลิตไฟโคไซยานินทั้งในรูปของเหลวและผงแห้งในชื่อต่างๆ กัน เช่น Bioprex's PC ในรูปผง (Bioprex Labs, 2005) Parry's PC (Parry Nutraceuticals, 2005) Linablue (Dainippon Ink & Chemicals, 2005) Deltablue™ - Phycocyanin (Biodelta, 2005) และ PhycoPro™ (PROZYME, 2005) มีทั้งชนิดที่ใช้ในอาหารซึ่งจะมีค่าความบริสุทธิ์ต่ำ และชนิดที่ใช้ในการตรวจสอบทางภูมิคุ้มกันวิทยาซึ่งมีความบริสุทธิ์สูงกว่าและมีราคาสูงกว่า

สำหรับไฟโคไซยานินชนิดที่ใช้ในอาหาร ความคงตัวและคุณสมบัติการใช้งานในอาหารมีความสำคัญอย่างยิ่ง ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวนอกจากจะเป็นคุณสมบัติเฉพาะตัวของไฟโคไซยานินเองแล้ว ยังขึ้นกับวิธีการสกัด การแปรรูป และสถานะการเก็บรักษา แต่องค์ความรู้ในด้านนี้ยังต้องได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะในประเทศไทย เนื่องจากประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตสาหร่ายสไปรูลินาที่สำคัญแห่งหนึ่งของโลก แต่มีผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสกัดและการศึกษาความคงตัวของไฟโคไซยานินอยู่เพียง 2 เรื่อง ซึ่งเป็นการเก็บในรูปของเหลว ในขณะที่ปัจจุบันมีการผลิตจากต่างประเทศในรูปของผงแห้งซึ่งสะดวกต่อการใช้งานและลดต้นทุนในการเก็บรักษา จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่นักวิจัยไทยจะต้องเร่งสร้างองค์ความรู้ดังกล่าวเพื่อใช้เป็นฐานในการสร้างมูลค่าเพิ่มให้แก่ประเทศต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลินา โดยใช้คลื่นอัลตราโซนิก (Sonication) การแช่เยือกแข็งสลับกับการละลาย และไลโซไซม์

1.2.2 เพื่อศึกษาผลของการทำแห้งด้วยวิธีทำแห้งแบบพ่นฝอยและสารเพิ่มความคงตัวของโปรตีนที่มีต่อคุณสมบัติของไฟโคไซยานินชนิดใช้ในอาหาร

1.2.3 เพื่อศึกษาผลของสภาวะการเก็บรักษาที่มีต่อความคงตัวของไฟโคไซยานินชนิดใช้ในอาหารในรูปผงแห้ง

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ได้องค์ความรู้เกี่ยวกับวิธีการสกัดสารประกอบไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลินาที่สามารถนำไปพัฒนาขยายขนาดสู่การผลิตในระบบอุตสาหกรรมได้จริง

1.3.2 เพิ่มมูลค่าแก่สาหร่ายสไปรูลินา

1.3.3 สามารถสร้างผลิตภัณฑ์อาหารชนิดใหม่จากการใช้สารประกอบไฟโคไซยานินเป็นส่วนผสม โดยมีจุดเด่นในด้านสี คุณค่าทางโภชนาการและโภชนะบำบัด

1.3.4 สร้างมูลค่าเพิ่มให้แก่ประเทศ

1.4 คำอธิบายศัพท์

อะโพอโรตีน (Apoprotein) คือส่วนของสายพอลิเพปไทด์ที่ยังไม่ก่อรูปเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับโมเลกุลอื่นที่ไม่ใช่โปรตีน

ไบลิน (Bilin) หรือมักเรียกว่า Bilichrome คือ สารรงควัตถุชีวภาพ (Biological pigment) มีโครงสร้างโมเลกุลเป็นเตตระไพร์รอล (Tetrapyrrole structure)

บทที่ 2

ปรีทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สาหร่ายสไปรูลีนา

สาหร่ายสไปรูลีนา (*Spirulina* sp.) ถูกค้นพบโดยนักวิทยาศาสตร์ชื่อ Turpin ในปี ค.ศ. 1827 โดยแยกได้จากตัวอย่างน้ำจืด (Ciferri, 1983) เป็นสาหร่ายที่มีขนาดเล็ก (Micro algae) มีโครงสร้างผนังเซลล์คล้ายแบคทีเรีย และถูกจัดให้เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่มีโครงสร้างเซลล์แบบ โปรคาริโอต (Prokaryote) ซึ่งในสารบบการจำแนกสายพันธุ์นั้น สาหร่ายสไปรูลีนาถูกจัดไว้ดังนี้

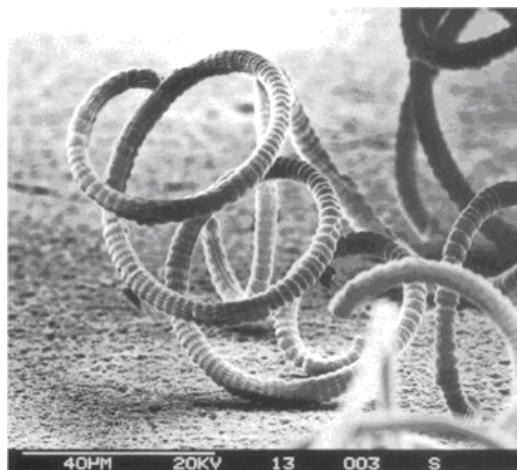
Division:	<i>Cyanophyta</i>
Class:	<i>Cyanophyceae</i>
Order:	<i>Oscillatoriale</i>
Family:	<i>Oscillatoriaceae</i>
Genus:	<i>Spirulina</i>

สาหร่ายที่อยู่ในดิวิชันไซยาโนไฟตามักถูกเรียกว่าไซยาโนแบคทีเรีย (Cyanobacteria) มีสีน้ำเงินแกมเขียว จึงถูกเรียกว่าเป็น “สาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว” หรือ “สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน” (blue-green algae) โดยชนิดที่นิยมนำมาบริโภคและสกัดไฟโคไซยานินได้แก่ *Spirulina platensis* และ *Spirulina maxima*

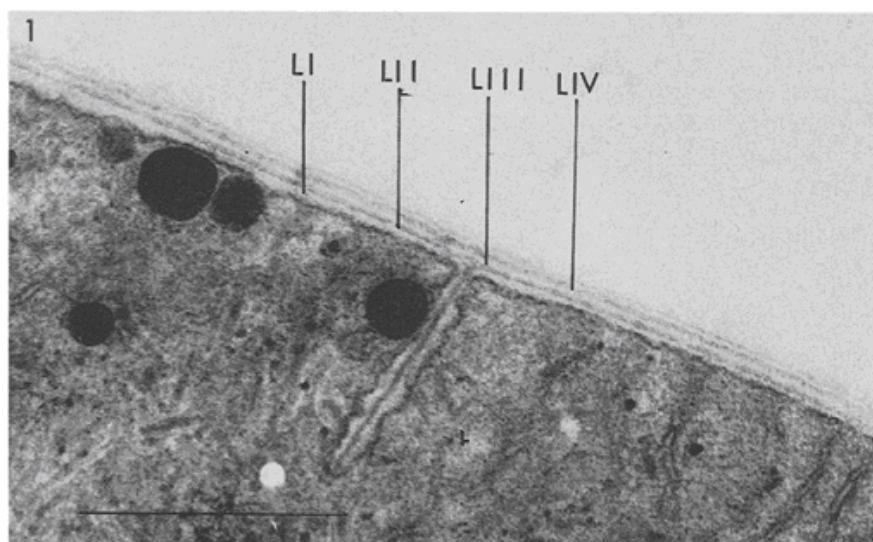
โครงสร้างเซลล์ของสาหร่ายสไปรูลีนามีลักษณะเป็นโครงสร้างหลายเซลล์ต่อกันเป็นสายยาว (Multicellular structure) หรือเรียกว่า Trichome cells สายของเซลล์เหล่านี้จะบิดตัวเป็นเกลียวภายในเซลล์ประกอบด้วยกลุ่มของฟองอากาศเล็กๆ จำนวนมาก ซึ่งช่วยให้สาหร่ายสามารถลอยตัวแขวนลอยในน้ำได้ (Ciferri, 1983) สายเซลล์ของสาหร่ายมีความกว้างอยู่ในช่วง 6 ถึง 12 ไมโครเมตร แต่ละเซลล์จะมีรูปทรงเป็นรูปทรงกระบอก เกลียวของสายเซลล์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 30 ถึง 70 ไมโครเมตร (Tomaselli, 1997) สายเซลล์แต่ละเส้นยาวประมาณ 500 ไมโครเมตร (ภาพที่ 2.1)

ผนังเซลล์ของสาหร่ายสไปรูลีนาเป็นผนัง 4 ชั้น มีชื่อเรียกเรียงลำดับจากชั้นในสุดเป็น ชั้น LI ชั้น LII ชั้น LIII และชั้น LIV ตามลำดับ (ภาพที่ 2.2 และรูปที่ 2.1) เยื่อหุ้มชั้นนอกสุด (layer IV)

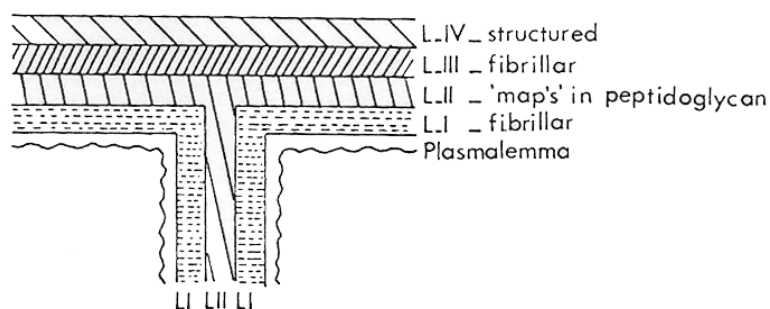
ประกอบด้วยไลโปพอลิแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharides, LPS) ซึ่งแต่ละโมเลกุลของ LPS จะเชื่อมต่อกันด้วยแคลเซียมและแมกนีเซียม ส่วน Layer III เป็นชั้นของเส้นไฮโปรตีน (Ciferri, 1983) สำหรับ Layer II เป็นชั้นที่แข็งแรงที่สุด ประกอบด้วยเปปติโดไกลแคน และชั้นในสุด (Layer I) มี β -1,2-glucan เป็นองค์ประกอบหลัก (Van Eykelenburg, 1978)



ภาพที่ 2.1 โครงร่างสำหรับ *S. platensis* จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด
ที่มา : จาก Ciferri (1983)



ภาพที่ 2.2 โครงสร้างผนังเซลล์ของ *S. platensis* จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน
แบบส่องผ่าน
ที่มา : จาก Van Eykelenburg, (1977)



รูปที่ 2.1 แบบจำลองโครงสร้างผนังเซลล์ของ *S. platensis*

ที่มา : จาก Van Eykelenburg, (1977)

เซลล์สดของสาหร่าย *S. platensis* ประกอบด้วยน้ำประมาณร้อยละ 90 (Jiraporn Pusri, 1995) และอุดมด้วยสารที่ให้คุณค่าทางโภชนาการ ดังแสดงในตารางที่ 2.1 ถึง 2.4 รงควัตถุสำคัญที่พบในสาหร่ายสไปรูลินาคือ แคโรทีนอยด์ คลอโรฟิลล์ และไฟโคไซยานิน ซึ่งพบในปริมาณร้อยละ 0.37 1.0 และ 14 ของน้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (Belay, 1997) เฉพาะไฟโคไซยานินคิดเป็นร้อยละ 40 ของโปรตีนทั้งหมด (Zhou และคณะ, 2005)

ตารางที่ 2.1 ไวตามินที่พบในสาหร่ายสไปรูลินาผง

ไวตามิน	มิลลิกรัม/100 กรัม
โปรไวตามินเอ	2.330.000 IU kg ⁻¹
เบต้าแคโรทีน	140
ไวตามินอี	100 α-tocopherol equiv.
ไวตามินบี 1 (Thiamin)	3.5
ไวตามินบี 2 (Riboflavin)	4
ไวตามินบี 3 (Niacin)	14
ไวตามินบี 6	0.8
ไวตามินบี 13	0.32
กรดโฟลิก	0.01
ไบโอติน (Biotin)	0.005
กรดแพนโทเทนิค (Phantothenic acid)	0.1
ไวตามินเค	2.2

ที่มา : จาก Belay (1997)

ตารางที่ 2.2 องค์ประกอบทางเคมีของสาหร่าย *S. platensis* และ *S. maxima*

สาหร่าย	ร้อยละของน้ำหนักแห้ง					
	น้ำ	เถ้า	ไขมัน	เยื่อใย	คาร์โบไฮเดรต	โปรตีน
<i>S. platensis</i>	6-10	4-5	9-14	3-8	10-18	56-77
<i>S. maxima</i>	4-7	6-9	4	1	8-13	60-71

ที่มา : จาก Ciferri (1983)

ตารางที่ 2.3 กรดไขมันที่พบในสาหร่าย *S. platensis*

กรดไขมัน	ร้อยละ
(C ₁₄) Myristic acid	0.23
(C ₁₆) Palmitic acid	46.07
(C _{16:1}) Δ^9 Palmitoleic acid	1.26
(C _{18:1}) Δ^9 Oleic acid	526
(C _{18:2}) $\Delta^{9,12}$ Linoleic acid	17.43
(C _{18:3}) $\Delta^{9,12,15}$ γ -Linolenic acid	8.87
อื่นๆ	20.88

ที่มา : จาก Othes และ Pire (2001)

ตารางที่ 2.4 แร่ธาตุที่พบในสาหร่ายสไปรูลินาผง

แร่ธาตุ	มิลลิกรัม/ร้อยละ	แร่ธาตุ	มิลลิกรัม/ร้อยละ
แคลเซียม	700	แมงกานีส	5
โครเมียม	0.28	ฟอสเฟต	800
ทองแดง	12	โปแตสเซียม	1400
เหล็ก	100	โซเดียม	900
แมกนีเซียม	400	สังกะสี	3

ที่มา : จาก Belay (1997)

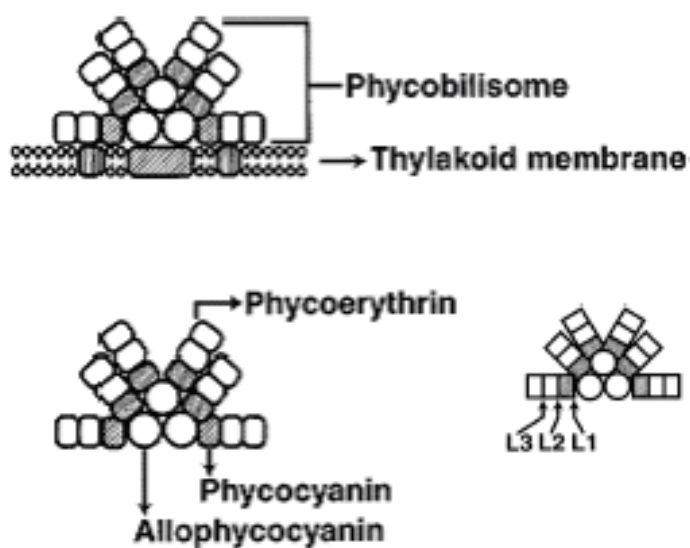
2.2 ไฟโคไบลิโซม (Phycobilisomes :PBS)

ไฟโคไบลิโซมเป็นสารประกอบโปรตีนที่ทำหน้าที่เก็บเกี่ยวพลังงานจากแสงแดดแล้วถ่ายทอดพลังงานดังกล่าวผ่านเยื่อหุ้มไทลาคอยด์ (Thylakoid membrane) เข้าสู่ระบบสังเคราะห์แสง

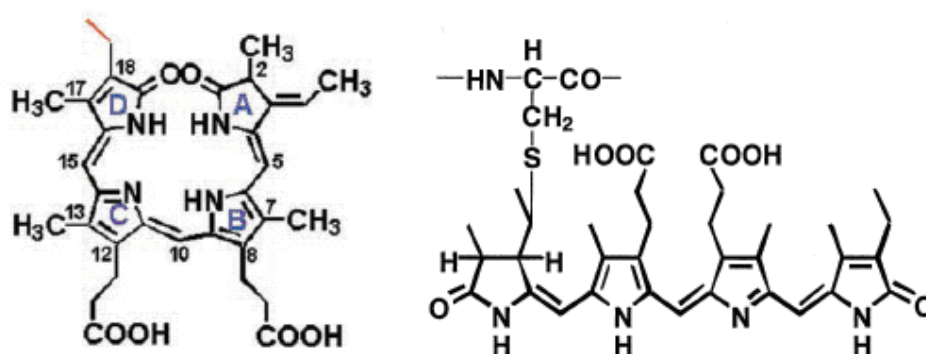
ของเซลล์ ซึ่งพบได้ในเซลล์พืชและสาหร่ายในกลุ่มไซยาโนแบคทีเรีย โมเลกุลของไฟโคไบลิโชมประกอบด้วย ไบลิโปรตีน (Biliprotein) และสายพอลิเพปไทด์ที่เป็นตัวเชื่อมโยง (Linker polypeptide) ดังแสดงในรูปที่ 2.2

ไบลิโปรตีนประกอบด้วยส่วนที่เป็นอะโพอโรตีน (Apoprotein) และส่วนของไบลิน (Bilin) ส่วนประกอบทั้งสองเชื่อมต่อกันด้วยพันธะไรโออีเทอร์ (Thioether bond) ระหว่างวงแหวนของไบลินกับกรดอะมิโนซิสเตอีน (Cystein) บนอะโพอโรตีน (รูปที่ 2.3)

ไบลิโปรตีนของไซยาโนแบคทีเรียจำแนกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ ไฟโคไซยานิน ไฟโคอิริทริน (Phycoerythrin: PE) และ อัลโลไฟโคไซยานิน (Allophycocyanin) สำหรับสาหร่าย *S. platensis* พบเฉพาะไฟโคไซยานินและอัลโลไฟโคไซยานิน (Padyana, Bhat, Madyastha, Rajashankar และ Ramakumar, 2001)



รูปที่ 2.2 แบบจำลองการจัดเรียงตัวของไฟโคไบลิโชม; รูปบนแสดงการเชื่อมต่อระหว่างไฟโคไบลิโชมกับเยื่อหุ้มไทลาคอยด์; รูปล่างซ้ายแสดงการจัดเรียงตัวของ 3 องค์ประกอบหลักในไฟโคไบลิโชม และภาพล่างขวาแสดงตำแหน่งที่อยู่ของ linker polypeptide ที่มา : จาก MacColl (1998)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างของไฟโคไซยานโนไบลีน (ซ้าย) และการเชื่อมต่อของไบลีนกับอะโปโปรตีน (ขวา) ที่มา : จาก Hanzawa และคณะ (2002) และ Fukui และคณะ (2004)

ไบลีนเป็นสารประกอบเชิงซ้อนที่ประกอบด้วยวงแหวนไพร์รอล (Pyrrole Ring) 4 วงต่อกันเป็นเส้นตรง เรียกว่า “เตตระไพร์รอล” (รูปที่ 2.3) สาหร่ายในกลุ่มไซยาโนแบคทีเรียส่วนใหญ่ประกอบด้วยไบลีน 4 ชนิด คือ (1) ไฟโคไซยานโนไบลีน (2) ไฟโคอีริโทรไบลีน (3) ไฟโคยูโรไบลีน และ (4) ไฟโควิโอลไบลีน หรือเรียกว่า ไฟโคไบลิวิโอลีน (Phycobiliviolin) ทั้งนี้ ไบลีนแต่ละชนิดจะมีจำนวนของพันธะคู่แบบคอนจูเกต (Conjugated Double Bond) บนโมเลกุลแตกต่างกัน (ตารางที่ 2.6)

ตารางที่ 2.6 จำนวนพันธะคู่แบบคอนจูเกตบนโมเลกุลของไบลีนแต่ละชนิด ที่พบในสาหร่ายในกลุ่มไซยาโนแบคทีเรีย

ไบลีน	จำนวนพันธะคู่แบบคอนจูเกต (คู่)
ไฟโคไซยานโนไบลีน (Phycocyanobilin: PCB)	8
ไฟโคอีริโทรไบลีน (Phycoerythrobilin: PEB)	6
ไฟโควิโอลไบลีน (Phycoviolobilin)	7
ไฟโคยูโรไบลีน (Phycourobilin)	5

ที่มา : จาก MacColl (1998)

2.3 การเขียนชื่อไฟโคไซยานิน

สัญลักษณ์และการเขียนชื่อไฟโคไซยานินโดยทั่วไปมักใช้คำนำหน้า (Prefix) คำว่า Phycocyanin เช่น C- หรือ R- เพื่อบอกถึงแหล่งที่มาของสารประกอบนั้นที่ค้นพบเป็นครั้งแรก ที่พบ

มากที่สุดคือ C-Phycocyanin ซึ่งเป็นไฟโคไซยานินที่พบในไซยาโนแบคทีเรีย ส่วน R-Phycocyanin เป็นไฟโคไซยานินที่พบในสาหร่ายสีแดงในคลาส *Rhodophyceae* (Glazer และ Hixson, 1975)

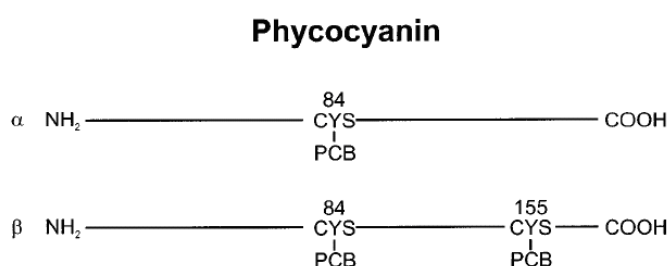
2.4 โมเลกุลของไฟโคไซยานิน

โดยทั่วไปโมเลกุลของไฟโคไซยานินจะรวมตัวอยู่ในรูปไตรเมอร์ ($\alpha_3\beta_3$) เฮกซะเมอร์ ($\alpha_6\beta_6$) และ โอลิโกเมอร์ (Oligomers) แบบอื่นๆ สารประกอบเชิงซ้อนเหล่านี้ก่อตัวขึ้นจากโมโนเมอร์ ($\alpha\beta$ -monomer) ของไฟโคไซยานิน ซึ่งประกอบด้วย หน่วยย่อยอัลฟา (α -subunit) และหน่วยย่อยเบต้า (β -subunit) โดยที่ หน่วยย่อยอัลฟา และหน่วยย่อยเบตาดังกล่าวแต่ละหน่วยจะมีโพลีเปปไทด์กับกรดอะมิโนซิสเทอีนบนอะพอโรตีนของหน่วยย่อย 1 และ 2 หมู่ตามลำดับ (ตารางที่ 2.7) ที่ตำแหน่ง α_{84} ของหน่วยย่อยอัลฟา และที่ตำแหน่ง β_{84} และ β_{155} ของหน่วยย่อยเบต้า (รูปที่ 2.4)

ตารางที่ 2.7 จำนวนโพลีเปปไทด์ต่อโมโนเมอร์ของโพลีโปรตีน

โปรตีน	โมโนเมอร์	จำนวนโพลีเปปไทด์/โมโนเมอร์
ไฟโคไซยานิน (C-PC)	α	1
	β	2
ไฟโคอิริทริน	α	2
	β	3
อัลโลไฟโคไซยานิน	α	1
	β	1

ที่มา : จาก MacColl (1998)



รูปที่ 2.4 ตำแหน่งการเกิดพันธะโควาเลนต์ระหว่างโพลีเปปไทด์กับอะพอโรตีนของ C-Phycocyanin

ที่มา : จาก MacColl (1998)

หน่วยย่อยอัลฟา และหน่วยย่อยเบต้าของไฟโคไซยานินประกอบด้วยกรดอะมิโนเรียงต่อกัน 162 และ 172 หน่วย ตามลำดับ ทั้ง R-Phycocyanin และ C-Phycocyanin ประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดเดียวกัน และสามารถจำแนกได้ดังนี้ (Kao, Edwards และ Berns, 1975)

กรดอะมิโนมีขั้ว

Acidic – Asp, Glu

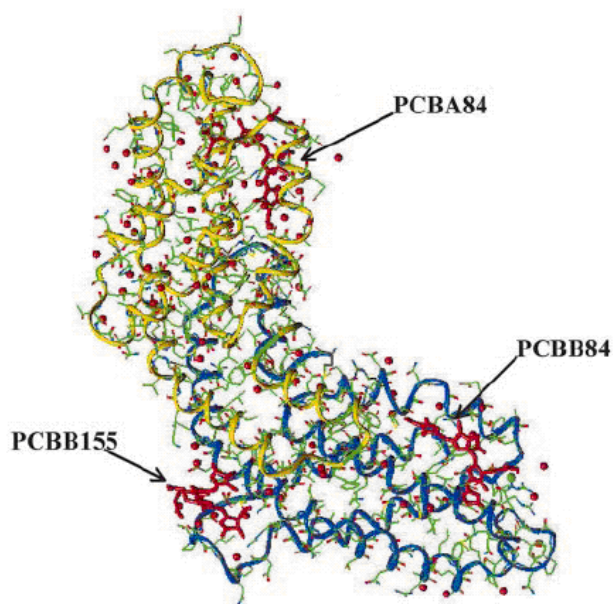
Basic – Lys, His, Arg

Hydroxy – Thr, Ser

กรดอะมิโนไม่มีขั้ว

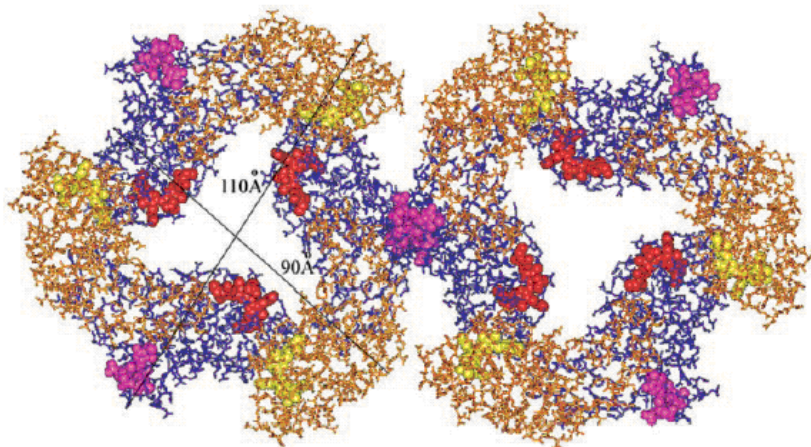
Aliphatic – Gly, Ala, Val, Ile, Leu, Pro, Met, Cys, Tyr, Phe

หน่วยย่อยทั้งสองของไฟโคไซยานินในโมโนเมอร์ ไตรเมอร์ และเฮกซะเมอร์ มีโครงสร้างตติยภูมิเป็นรูปทรงกลม (Globular) คล้ายกันมาก (รูปที่ 2.5 และ 2.6) เมื่อก่อรูปเป็นไตรเมอร์และเฮกซะเมอร์ จะเกิดช่องว่างขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5 ถึง 4.5 นาโนเมตร โดยที่ตำแหน่ง β_{84} จะหันเข้าหาแกนกลางของช่องว่าง



รูปที่ 2.5 โครงสร้างการจัดเรียงโมเลกุลของไฟโคไซยานินโมโนเมอร์

ที่มา : จาก Adir, Dobrovetsky และ Lerner (2001)



รูปที่ 2.6 ยูนิตเซลล์ (unit cell) ของไฟโคไซยานิน 612

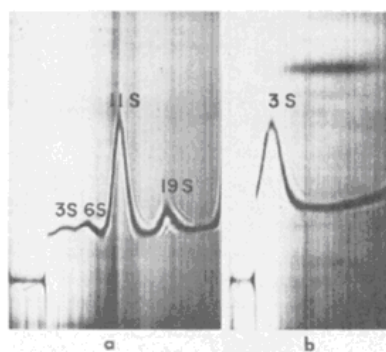
ที่มา : จาก Adir และ Lerner (2003)

สายพอลิเพปไทด์ของหน่วยย่อยทั้งสองประกอบด้วยเกลียวอัลฟา (α -helices) 9 ชุด แต่ละชุดต่อกันด้วยตำแหน่งโค้งงอของโครงสร้าง (MacColl, 1998) การก่อรูปตติยภูมิดังกล่าวข้างต้นนั้น หน่วยย่อย แต่ละหน่วยจะถูกตรึงด้วยแรงแวนเดอร์วาลส์ (Van der Waals) และอันตรกิริยาไฟฟ้าสถิต (Electrostatic interactions) ซึ่งพบว่าที่แกนกลางของเฮกซะเมอร์มีสนามไฟฟ้าสถิต (Electrostatic field) เป็นลบ ในขณะที่บริเวณผิวด้านนอกจะเป็นบวก (Stec, Troxler และ Teeter, 1999)

ณ สภาวะสมดุลหนึ่งๆ สารละลายไฟโคไซยานินจะประกอบด้วยส่วนผสมระหว่างโมโนเมอร์ ไตรเมอร์ และเฮกซะเมอร์ โดยสามารถเปลี่ยนรูประหว่างกันได้ (Berns และ MacColl, 1989) ทั้งนี้ขึ้นกับความเข้มข้นของไฟโคไซยานิน ค่าพีเอช ค่าความเข้มข้นของไอออน (Ionic strength) รวมถึงอุณหภูมิ ซึ่ง Berns และ MacColl (1989) พบว่าไฟโคไซยานินจะรวมตัวเป็นโครงสร้างที่ใหญ่ขึ้นและไม่พบไตรเมอร์เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้น สำหรับที่พีเอช 5.7 ความเข้มข้น 1-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไฟโคไซยานินจะรวมตัวเป็นเฮกซะเมอร์ ส่วนที่พีเอช 8.0 ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ไฟโคไซยานินส่วนใหญ่จะรวมตัวเป็นไตรเมอร์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kao, Edwards และ Berns (1975)

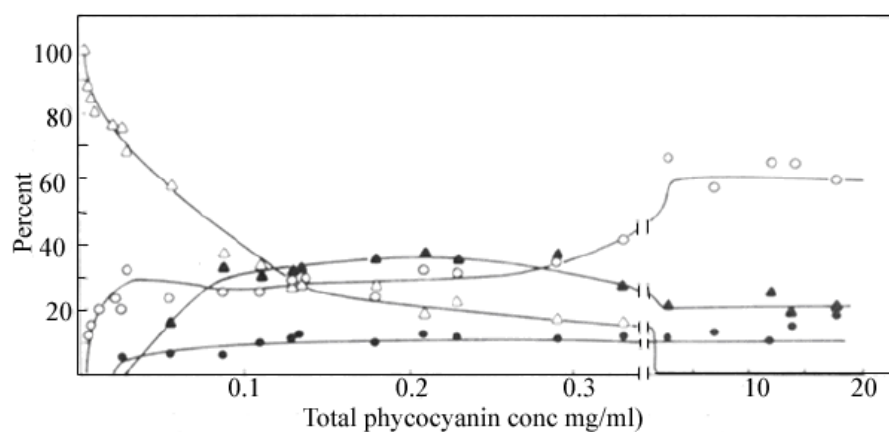
นอกจากนี้ Berns และ MacColl (1989) ยังพบว่า ที่พีเอช 6.8 ไฟโคไซยานินจะรวมตัวเป็นไตรเมอร์ และจะเปลี่ยนเป็นเฮกซะเมอร์ที่พีเอช 5.0 แต่ถ้าความเข้มข้นสูงถึง 40 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรจะพบทั้งไตรเมอร์และเฮกซะเมอร์ ซึ่งสามารถเปลี่ยนรูประหว่างกันได้ในช่วงพีเอชระหว่าง 5.0 ถึง 9.0 ทั้งนี้ อุณหภูมิและค่าความเข้มข้นของไอออนจะมีผลต่อสัดส่วนระหว่างรูปทั้งสอง และที่พีเอช 5.0 จะพบโมโนเมอร์ในปริมาณที่น้อยมาก

Berns และ MacColl (1989) พบว่าที่พีเอช 4.7 ความเข้มข้น 13 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะก่อรูปเป็นโมโนเมอร์ (3S) ในปริมาณน้อยมาก แต่จะพบไตรเมอร์ (6S) เฮกซะเมอร์ (11S) และ เฮกซะเมอร์ที่รวมตัวกันใหญ่ขึ้น (19S) ดังภาพที่ 2.9a ที่พีเอช 3.9 ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร ไฟโคไซยานินจะเปลี่ยนรูปเป็นโมโนเมอร์ทั้งหมด (ภาพที่ 2.3b) ส่วนที่พีเอช 6.0 เมื่อแปร ความเข้มข้นของไฟโคไซยานินจะได้ผลดังรูปที่ 2.7



ภาพที่ 2.3 ผลการศึกษา Sedimentation velocity ของไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *Lyngbya* sp.

ที่มา : จาก Berns และ MacColl (1989)



รูปที่ 2.7 อัตราการรวมตัวของไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสายพันธุ์ *Lyngbya* sp. ที่ความเข้มข้นของไฟโคไซยานินต่างๆ กันในสารละลายบัฟเฟอร์ pH 6.0 ณ อุณหภูมิห้อง;

(Δ) โมโนเมอร์; (\blacktriangle) ไตรเมอร์; (\circ) เฮกซะเมอร์ และ (\bullet) เฮกซะเมอร์ที่รวมตัวกัน

ที่มา : จาก Berns และ MacColl (1989)

2.5 คุณสมบัติของไฟโคไซยานิน

ไฟโคไซยานินเป็นสารประกอบที่มีสีฟ้าเรืองแสงได้ และละลายน้ำได้ นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ คุณสมบัติเหล่านี้อาจแตกต่างกันทั้งนี้ขึ้นกับแหล่งที่มาของไฟโคไซยานิน (ตารางที่ 2.8 และ 2.9) วิธีการเพาะเลี้ยง วิธีการสกัดออกจากเซลล์ของสาหร่าย และกระบวนการหลังการสกัด (Edwards, Hauer, Stack, Eisele และ MacColl [1997] และ Fukui และคณะ [2004])

โดยทั่วไป ไฟโคไซยานินจะให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด (λ_{\max}) ในช่วงความยาวคลื่น 612 ถึง 620 นาโนเมตร และเมื่อเรืองแสงจะวัดค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดได้ที่ช่วงความยาวคลื่น 636 ถึง 650 นาโนเมตร (Adir และ Lerner [2003] และ MacColl [1998]) ไฟโคไซยานินที่อยู่ในรูปโมโนเมอร์ ไตรเมอร์ หรือเฮกซะเมอร์จะให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ช่วงความยาวคลื่นที่ต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 2.10 ส่วนอัลโดไฟโคไซยานิน และไฟโคอิทรินนั้นจะมีสีฟ้าน้ำทะเล และสีชมพู เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงจะให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดในช่วงความยาวคลื่น 650 ถึง 655 นาโนเมตร และ 540 ถึง 570 นาโนเมตรตามลำดับ (Viskari และ Colyer, 2003)

ตารางที่ 2.8 คุณสมบัติการดูดกลืนแสงและการเรืองแสงของไฟโคไซยานินจากสาหร่ายชนิดต่างๆ

ไฟโคไซยานิน	ชนิด	λ_{\max}	Fluorescence emission
		(นาโนเมตร)	λ_{\max} (นาโนเมตร)
C-PC	<i>Anacystis nidulans</i> ⁽¹⁾	620(PCB)	648
	<i>Spirulina (Arthrospira) fusiformis</i> ⁽¹⁾	620	650
	<i>Thermosynechococcus vulcanus</i> ⁽²⁾	612	
R-PC	<i>Porphyridium cruentum</i> ⁽¹⁾	617(PCB)	636
		555 (PEB)	

⁽¹⁾ MacColl (1998)

⁽²⁾ Adir and Lerner (2003)

ตารางที่ 2.9 นำหนักโมเลกุลของ C-Phycocyanin จากสาหร่ายในกลุ่มไซยาโนแบคทีเรีย

ชนิดของสาหร่าย	Native C-PC (KDa)	หน่วยย่อยเบต้า (KDa)	หน่วยย่อยอัลฟา (KDa)
<i>Spirulina</i> sp. (น้ำจืด)	112	24.4	17
<i>Phormidium</i> sp. (น้ำเค็ม)	131	24.4	19.1
<i>Lyngbya</i> sp. (น้ำเค็ม)	81	24.4	15.2

ที่มา : จาก Patel, Mishra, Pawar และ Ghosh (2005)

ตารางที่ 2.10 ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของ C-PC เมื่ออยู่ในรูปต่างๆ

รูปแบบการรวมตัว	λ_{\max} (นาโนเมตร)		
	<i>S. lcidus</i> (SyI)	<i>P. luridum</i>	<i>A. nidulans</i>
ไฟโคไบลิโชม		627	
โอลิโกเมอร์ ($\alpha_6\beta_6$) ₃	608		
เฮกซาเมอร์	609	622	621
ไตรเมอร์	609	618	
โมโนเมอร์	607	615	615
หน่วยย่อยอัลฟา			620
หน่วยย่อยเบต้า			608

ที่มา : จาก Edwards, MacColl, และ Eisele (1996)

2.6 คุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของไฟโคไซยานิน

ไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *S. platensis* มีความสามารถในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิล (Hydroxyl radicals) และอนุมูลเปอร์ออกซิล (Peroxyl radical) โดยมีไฟโคไซยานินไบลินทำหน้าที่ในการต้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันและกำจัดอนุมูลอิสระ (Bhat และ Madyastha, 2000) ไฟโคไซยานินที่สกัดจากสาหร่าย *Aphanizomenon flos-aquae* (AFA) ในกลุ่มไซยาโนแบคทีเรีย ก็มีความสามารถกำจัดอนุมูลเปอร์ออกซิลได้เช่นเดียวกัน (Benedetti, Benvenuti, Pagliarani, Francogli, Scoglio และ Canestrari, 2004) แต่ Zhou และคณะ (2005) พบว่าไฟโคไซยานินจากสาหร่าย *S. platensis* จะสร้างอนุมูลไฮดรอกซิลในสภาวะที่มีแสง แต่จะกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิลในสภาวะที่ไม่มีแสง การทำให้ไฟโคไซยานินเสียสภาพทางธรรมชาติโดยใช้สารเคมี จะทำให้ความสามารถในการสร้างอนุมูลดังกล่าวหมดไป ในทางตรงกันข้ามไฟโคไซยานินที่สูญเสียสภาพ

ทางธรรมชาติจะมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิลเพิ่มขึ้น ซึ่งชี้ว่าไฟโคไซยานโนไบลินทำหน้าที่หลักในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิล และพบว่าส่วนของอะโปโปรตีนก็มีคุณสมบัตินี้ด้วย เช่นเดียวกัน (Bhat และ Madyastha, 2001) ความสามารถในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิลดังกล่าวยังเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของไฟโคไซยานินที่เพิ่มขึ้น (Estrada, Bescos และ Fresno, 2001)

2.7 ไฟโคไซยานินที่ผลิตเป็นการค้า

ไฟโคไซยานินที่ผลิตเป็นการค้ามีทั้งชนิดที่ใช้ในงานวิเคราะห์ทางเคมีและชีวเคมี ชนิดที่ใช้เป็นสารให้สี (Colorant) ในอาหารและเครื่องสำอาง ซึ่งมีทั้งที่อยู่ในรูปผงแห้งและเป็นของเหลว เช่น Deltablue™ -PC จากบริษัท Bidelta Pty (Ltd) ประเทศแอฟริกาใต้ สกัดจากสาหร่าย *S. platensis* ไฟโคไซยานิน Deltablue™ ชนิดที่ใช้ในอาหารและเครื่องสำอางจะมีค่าความบริสุทธิ์มากกว่า 0.5 (คำนวณจากอัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 และ 280 นาโนเมตร) มีความคงตัวในช่วงพีเอชระหว่าง 5 ถึง 7.5 (Bidelta, 2005)

Parry's PC จากบริษัท Parry Nutraceutical เป็นผลิตภัณฑ์ที่อยู่ในรูปผงแห้ง ผลิตออกจำหน่าย 2 ชนิด คือชนิดความบริสุทธิ์สูงใช้สำหรับการตรวจวัดทางภูมิคุ้มกันวิทยา และชนิดความบริสุทธิ์ต่ำกว่าซึ่งใช้สำหรับงานอื่นๆ นอกเหนือจากการตรวจวัดทางภูมิคุ้มกันวิทยา โดยบรรจุในถุงอลูมิเนียมเคลือบชนิดใช้กับอาหารและดัดแปรบรรยากาศด้วยก๊าซไนโตรเจน และต้องเก็บรักษาในที่ที่ไม่มีแสงและความชื้นต่ำ

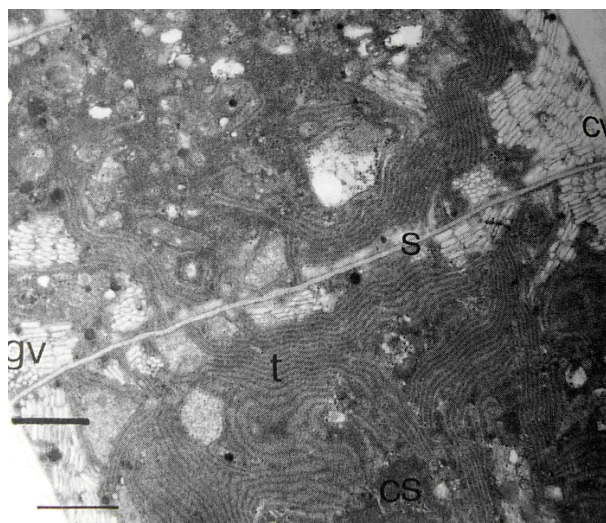
นอกจากนี้ยังมีไฟโคไซยานินที่มีชื่อทางการค้าอื่นๆ เช่น Bioprex's PC ในรูปผง จากบริษัท Bioprex Labs ผลิตภัณฑ์ Linablue จากบริษัท Dainippon Ink & Chemicals ประเทศญี่ปุ่น ผลิตภัณฑ์ PhycoPro™ จากบริษัท Prozyme ซึ่งใช้สำหรับงานวิเคราะห์ และผลิตภัณฑ์ Linablue จากบริษัท Loyalka Biotech ประเทศอินเดีย

Bhaskar, Gopalswamy และ Raghu (2005) กล่าวว่าไฟโคไซยานินที่ใช้ในอุตสาหกรรมยาต้องใช้ชนิดที่มีความบริสุทธิ์ 4.0 ส่วนชนิดที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต้องใช้ชนิดที่มีความบริสุทธิ์ 2.0

2.8 การสกัดไฟโคไซยานิน

ในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการมาตรฐานสำหรับการสกัดสารประกอบไฟโคไซยานินจากเซลล์สาหร่ายสไปรูลีนา แต่โดยทั่วไปจะต้องทำลายผนังเซลล์ก่อนเพื่อให้สามารถแยกไฟโคไซยานินออกมาได้ เนื่องจากไฟโคไลโซมจะเกาะอยู่กับเยื่อไทลาคอยด์ซึ่งกระจายตัวอยู่ภายในเซลล์ของสาหร่ายสไปรูลีนา ดังภาพที่ 2.4 สาหร่ายที่จะนำมาสกัดนั้นใช้ได้ทั้งเซลล์สดและเซลล์แห้ง

จากการศึกษาของ Sarada, Pillai และ Ravishankar (1999) พบว่าเซลล์ของสาหร่ายสดจะให้ผลผลิตไฟโคไซยานินสูงกว่าการใช้เซลล์แห้ง โดยที่การทำแห้งสาหร่ายสไปรูลีนาด้วยวิธีต่างๆ กัน เช่น การทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นฝอย และการทำแห้งด้วยตู้อบลมร้อนจะสูญเสียไฟโคไซยานินถึงร้อยละ 45 เมื่อเทียบกับการใช้เซลล์สด



ภาพที่ 2.4 โครงสร้างภายในของสาหร่าย *S. maxima*; S = septum, t= เยื่อไทลาคอยด์
ที่มา : จาก Vonshak และ Tomaselli (2000)

การทำลายผนังเซลล์ของสาหร่ายสไปรูลีนา สามารถทำได้ทั้งโดยใช้วิธีการทางกายภาพ และการย่อยผนังเซลล์ด้วยสารเคมีและเอนไซม์ หรือใช้วิธีการเหล่านี้ร่วมกัน วิธีการทางกายภาพที่ใช้ได้แก่

- การใช้คลื่นอัลตราโซนิก
- การใช้เฟรนช์เพรส (french press)
- Nitrogen cavitation
- liquid nitrogen freeze-thaw
- mortar/pestle grinding
- liquid nitrogen freeze-grind

การสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลีนา โดยการทำลายเซลล์ด้วยวิธีการแช่เยือก-แข็งสลับกับการละลาย (Repeated freezing and thawing: RFT) การบดด้วยโกร่งและครกบด (Mortar and pestle) และการใช้เครื่องปั่นผสม (Blender) จะได้ไฟโคไซยานินประมาณ 19.4 ± 0.4

มิลลิกรัมต่อร้อยละของน้ำหนักสาหร่ายแห้ง แต่การสกัดด้วยน้ำกลั่นจะใช้เวลานาน 3 ถึง 4 วันจึงจะสกัด ไฟโคไซยานินได้ปริมาณเท่ากัน (Sarada, Pillai และ Ravishankar, 1999)

น้ำกลั่นหรือน้ำบริสุทธิ์สามารถทำลายผนังเซลล์ของสาหร่ายสไปรูลีนาได้โดยผลของแรงดันออสโมติก (Han, Pyo และ Yang, 2003) หรือ Osmotic shock เช่นเดียวกับแคลเซียมคลอไรด์ (Yoshui, Akiko และ Masaki [2003], Rebeller [1982] และ Jiraporn Pusri [1995]) ซึ่งจะเกิดในกรณี que เซลล์อยู่ในสารละลายเจือจาง โดยเซลล์จะดูดซับน้ำจนบวมต่ง กระทั่งทนต่อแรงดันต่งภายในเซลล์ไม่ไหว เซลล์ก็จะแตกในที่สุด ซึ่งในกรณีนี้ เวลาเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการทำลายผนังเซลล์

Bhaskar, Gopalaswamy และ Raghu (2005) สกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลีนาโดยการทำลายผนังเซลล์ด้วยไนโตรเจนเหลว

Yoshui, Akiko และ Masaki (2003) และ Rebeller (1982) ใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ร่วมกับการใช้คลื่นอัลตราโซนิคในการสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสีน้ำเงินแกมเขียว

Jiraporn Pusri (1995) สกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลีนาโดยการทำลายผนังเซลล์ด้วย French Press ร่วมกับการทำ Osmotic shock ด้วยสารละลายแคลเซียมคลอไรด์

สารเคมีที่ใช้ในการย่อยผนังเซลล์ได้แก่ Ethylenediaminetetraacetate (EDTA) ซึ่งจะทำลายโปรตีนเพอริพลาสมิก (Periplasmic protein) ในผนังเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบ ส่วนสารลดแรงตึงผิว เช่น Nonionic detergent Triton X-100 สามารถละลายไขมันในเยื่อหุ้มเพอริพลาสมิก (Periplasmic membrane) และผนังเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบได้ (Hatti-Kaul และ Mattiasson, 2003)

สารละลายกรด เช่น สารละลายกรดฟอสฟอริก และกรดไฮโดรคลอริก ก็สามารถใช้ในการทำลายผนังเซลล์ของสาหร่ายได้ (Yoshui, Akiko และ Masaki [2004] และ Sarada, Pillai และ Ravishankar [1999])

Viskari และ Colyer (2003) สกัดไฟโคไบลิโปรตีนจากสาหร่าย *Synechococcus CCMP 833* โดยใช้สารละลาย 3-[(3-cholamidopropyl) dimethyammonio] propanesulfonic acid หรือ Chaps โดยมี Asolectin ร้อยละ 0.3 ร่วมกับการทำให้เกิดฟองภายในเซลล์ด้วยไนโตรเจน (Nitrogen cavitation) ซึ่งพบว่าให้ประสิทธิภาพในการสกัดมากกว่าร้อยละ 85 และใช้เวลาต่ำกว่า 3 ชั่วโมง

2.9 การสกัดไฟโคไซยานินด้วยการแช่เยือกแข็งสลับกับการละลาย คลื่นอัลตราโซนิก และไลโซโซม

การสกัดไฟโคไซยานินโดยวิธีการแช่เยือกแข็งสลับกับการละลาย เกิดขึ้นโดยกลไกการเกิดผลึกน้ำแข็งและการขยายขนาดของผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นระหว่างกระบวนการแช่เยือกแข็ง ซึ่งเป็นกลไกสำคัญในการทำลายผนังเซลล์ชั้นใน ทำให้ผนังเซลล์เกิดเป็นรูรั่ว (Transient pores) ขึ้นในระหว่างการละลายน้ำแข็ง เป็นผลให้เกิดการแพร่กระจายของเอนไซม์และโปรตีนออกสู่ภายนอกเซลล์ ซึ่งปัจจัยสำคัญที่ทำให้เกิดการแพร่กระจายดังกล่าวคืออัตราการละลายน้ำแข็ง (Rate of thawing) และความคงตัวของรูรั่วภายในเซลล์ ซึ่งที่ผิวนอกจะมีอัตราการละลายน้ำแข็งสูงกว่าภายใน ขณะที่อุณหภูมิในการละลายน้ำแข็งจะมีผลต่อความคงตัวของรูรั่วภายในเซลล์ ซึ่งการละลายน้ำแข็ง ที่อุณหภูมิต่ำจะทำให้รูรั่วภายในเซลล์คงตัวอยู่ได้นานก่อนจะปิดตัวลง

กลไกในการสกัดไฟโคไซยานินจากเซลล์สาหร่ายด้วยคลื่นอัลตราโซนิก เป็นการทำลายผนังเซลล์ของสาหร่ายเพื่อปลดปล่อยไฟโคไซยานินออกจากเซลล์ด้วยแรงเฉือนซึ่งเกิดจากคลื่นเสียงที่มีความถี่สูงกว่า 20 กิโลเฮิร์ตซ์ แรงสั่นสะเทือนจากคลื่นเสียงความถี่สูงดังกล่าวทำให้เกิดฟองอากาศขนาดเล็กขึ้นในสารแขวนลอยและภายในเซลล์ของสาหร่าย เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า “Cavitation” จากปรากฏการณ์ดังกล่าว ฟองอากาศจะถูกสร้างขึ้น และทำให้ขยายขนาดจนกระทั่งแตกสลาย เป็นผลให้เกิดคลื่นสะท้อน (Shock wave) อย่างรุนแรงขึ้น ณ จุดต่างๆ ทั้งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ของสาหร่าย ส่งผลให้เกิดความแตกต่างของแรงเฉือนที่รุนแรง ณ จุดต่างๆ ซึ่งกระทำต่อเซลล์ เป็นผลให้ผนังเซลล์ฉีกขาดในที่สุด

การทำลายผนังเซลล์โดยใช้คลื่นอัลตราโซนิกเพียงอย่างเดียวจะให้ผลต่อการสกัดไฟโคไซยานินต่ำกว่าเมื่อใช้ร่วมกับเม็คตราทะเลเย็ด ซึ่งให้อัตราการสกัดสูงถึงร้อยละ 76.9 (Viskari และ Colyer, 2003) และจากการศึกษาของ Rezwan, Lanéelle, Sander และ Daffé (2007) พบว่าการใช้คลื่นอัลตราโซนิกเพียงอย่างเดียวจะให้ผลการสกัดต่ำที่สุด (ตารางที่ 2.11) โดยที่ความถี่ของคลื่นเป็นปัจจัยสำคัญต่อประสิทธิภาพในการสกัด (Furuki และคณะ, 2003)

ในขณะที่ไลโซโซมเป็นเอนไซม์ที่มีประสิทธิภาพในการย่อยผนังเซลล์ชั้น LII ซึ่งเป็นชั้นที่แข็งแรงที่สุด โดยไลโซโซมจะตัดพันธะ β -1,4-glucosidic ในโมเลกุลของ Peptidoglycan (Hatti-Kaul และ Mattiasson, 2003) แต่สำหรับแบคทีเรียแกรมลบรวมถึงสาหร่ายสาโปรตีนามีโครงสร้างผนังเซลล์แบบเดียวกันนั้น จะต้องทำลายผนังเซลล์ชั้นนอกก่อนเพื่อเปิดทางให้ไลโซโซมเข้าถึงชั้น Peptidoglycan ได้ เช่น การใช้สารลดแรงตึงผิว หรือ สารกำจัดไออนเพื่อทำลายผนังเซลล์ชั้นนอก หรือการทำลายผนังเซลล์ด้วยวิธีทางกายภาพ ดังเช่นในตารางที่ 2.11 ซึ่งพบว่า การใช้ไลโซโซมย่อย

ผนังเซลล์หลังการทำลายผนังเซลล์ด้วยวิธีทางกายภาพด้วยวิธีอื่นๆ แล้วนั้น จะสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดได้

ตารางที่ 2.11 เปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดโปรตีนจากเซลล์ของสาหร่าย *Mycobacterium smegmatis* ด้วยวิธีต่างๆ กัน

วิธีทำให้เซลล์แตก	ปริมาณโปรตีนที่สกัดได้ (mg/ml) ต่อกรัมของสาหร่าย
Cell disrupter	18.7
French press	18.9
Bead beater	7.6
Bead beater plus lysozyme	25.6
Sonication	6
Sonication plus lysozyme	11.6
Lysozyme	0.2

ที่มา : จาก Rezwan, Lanéelle, Sander และ Daff   (2007)

2.10 การสูญเสียสภาพทางธรรมชาติและความคงตัวของไฟโคไซยานิน

เนื่องจากไฟโคไซยานินมีโครงสร้างโมเลกุลเป็นโปรตีน ดังนั้นความคงตัวของไฟโคไซยานินจึงเกี่ยวข้องกับการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติของโปรตีนซึ่งส่งผลต่อคุณสมบัติของโปรตีนนั้น ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับความคงตัวของไฟโคไซยานินได้แก่ อุณหภูมิ ตัวทำละลาย ค่าพีเอช แรงกล และความเข้มข้นของไฟโคไซยานินเอง (Houghton, 2000)

การสูญเสียสภาพทางธรรมชาติของไฟโคไซยานินมีลักษณะเป็นสมการอันดับ 1 และมีค่าคงที่อัตรา (Rate constant) ที่พีเอช 5.0 และอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็น 4.37×10^{-5} ต่อวินาที และจะเพิ่มขึ้นเป็น 5.46×10^{-5} ต่อวินาที ที่พีเอช 7.0 อัตราการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติจะสูงขึ้นมากที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส (7.96×10^{-4} ต่อวินาที ที่พีเอช 7.0) เมื่อเทียบกับที่พีเอช 5.0 (1.46×10^{-4} ต่อวินาที) ไฟโคไซยานินจะมีความคงตัวต่อความร้อนสูงสุดที่พีเอช 5.0 (Patel, Pawar, Mishra, Sonawane และ Ghosh, 2004) แต่ Sarada, Pillai และ Ravishankar (1999) พบว่าไฟโคไซยานินจะคงตัวในช่วงพีเอช ระหว่าง 5.0 ถึง 7.5 ที่อุณหภูมิ 9 ± 1 องศาเซลเซียส และจะไม่คงตัวที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส

จากการศึกษาของ Jiraporn Pusri (1995) พบว่าสารละลายไฟโคไซยานินในรูปของเหลว จะไม่คงตัวในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง และในสภาวะที่มีความเป็นกรดสูง หรือเป็นด่างสูง ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียสเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสม และพีเอชที่เหมาะสมคือช่วง 5 ถึง 9 และยังพบว่าไฟโคไซยานินจะไม่คงตัวที่อุณหภูมิห้อง การเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จะให้ความคงตัวมากกว่าที่ 4 องศาเซลเซียส ในขณะที่ตัวทำละลายอินทรีย์และน้ำตาลกลูโคสจะช่วยเพิ่มความคงตัวของสารละลายไฟโคไซยานินที่อุณหภูมิห้อง

Boosya Bunnag (1995) พบว่าไฟโคไซยานินชนิดที่ใช้ในอาหารในสารละลายน้ำตาลกลูโคสเข้มข้นร้อยละ 20 สามารถเก็บได้นานถึง 2 เดือน เมื่อเก็บที่พีเอช 5 ถึง 9 และอุณหภูมิต่ำกว่า 55 องศาเซลเซียส

เมื่อได้รับความร้อนและแสงแดด สารละลายไฟโคไซยานินจะไม่คงตัว ที่พีเอช 3.0 ไฟโคไซยานินจะไม่ละลาย และจะสูญเสียสภาพทางธรรมชาติที่อุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส ส่วนที่พีเอช 5 และ 7 จะเหนี่ยวนำให้สีของไฟโคไซยานินเปลี่ยนแปลง (Jespersen, Stromdahl, Olsen และ Skibsted, 2004) จากรายงานของ Couteau, Baudry, Roussakis และ Coiffard (2004) พบว่าไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลินาจะคงตัวที่พีเอชต่ำกว่า 7.0 และจะเกิดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติเมื่อได้รับความร้อน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีสมการอัตราเป็นอันดับ 1 (First order rate reaction)

2.11 สารเพิ่มความคงตัวสำหรับการทำแห้งไฟโคไซยานิน

การทำแห้งไฟโคไซยานินสามารถใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารเพิ่มความคงตัวที่ความเข้มข้นระหว่าง 0.1 ถึง 1 โมลต่อลิตร สารเพิ่มความคงตัวชนิดอื่น เช่น น้ำตาล กลีเซอรอล สารโพลิเมอร์ และตัวทำละลายร่วม (Cubiciotti, 1997) ซึ่งสารเพิ่มความคงตัวเหล่านี้จะสร้างพันธะไฮโดรเจนกับโปรตีนโดยตรงในระหว่างกระบวนการทำแห้งโดยการแช่เยือกแข็ง โดยเข้าไปแทนที่โมเลกุลของน้ำเพื่อรักษาสภาพธรรมชาติของโปรตีนระหว่างกระบวนการทำแห้ง (Arakawa, Prestrelski, Kenney และ Carpenter, 2001) ทั้งนี้ สารเพิ่มความคงตัวที่อยู่ในสถานะอสัณฐาน (Amorphous state) จะก่อพันธะไฮโดรเจนได้ดีที่สุด (Costantino, Curley, Wu และ Hsu, 1998)

น้ำตาลอัลกอฮอล์ (Sugar alcohol) หรือเรียกว่าสารพอลิออล (Polyol) เป็นสารอีกกลุ่มหนึ่งที่นิยมใช้เป็นสารให้ความคงตัวแก่โปรตีน เช่น กลีเซอรอล และมอลติตอล การเพิ่มความเข้มข้นของสารเหล่านี้ระหว่างร้อยละ 10 ถึงร้อยละ 40 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และปรับพีเอชให้อยู่ระหว่าง 1.9 ถึง 7.0 จะช่วยขยายช่วงการเริ่มเสียดสภาพทางธรรมชาติ (Denaturizing lag phase) ของโปรตีนให้กว้างขึ้น (Haque, Singha, Moosavi-Movahedi และ Ahmad, 2005)

โดยปกติกลีเซอรอลจะมีสถานะเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง เนื่องจากมีค่า T_g ประมาณ -88 องศาเซลเซียส การนำมาใช้ในอาหารและเครื่องสำอาง มักนิยมใช้เป็นสารให้ความหวาน และเป็นสารช่วยรักษาความชื้น (Humectants) ใช้เป็นตัวทำละลายสำหรับสารที่ให้กลิ่นรสและที่สารให้สี ใช้เป็นสารเพิ่มความนุ่ม (Softening agent) และสารเพิ่มความข้นหนืด (Thickening agent) และยังเป็นสารเพิ่มปริมาณ (Filler) ในอาหารไขมันต่ำ นอกจากนี้ ยังสามารถใช้เป็นสารให้ความคงตัวแก่โปรตีนและเอนไซม์ที่ต้องเก็บรักษาด้วยการแช่เยือกแข็งหรือการทำแห้ง

มอลติตอลซึ่งเป็นสารที่ผลิตได้จากการนำน้ำตาลมอลโตส ซึ่งผ่านกระบวนการไฮโดรจิเนชัน (Hydrogenation) นิยมใช้เป็นสารทดแทนสารให้ความหวานเนื่องจากมีค่าความหวานร้อยละ 90 ของน้ำตาลซูโครส แต่ร่างกายมนุษย์ไม่สามารถดูดซึมไปใช้ประโยชน์ได้

ไฟโคไซยานินที่ทำให้อยู่ในรูปสารละลายเข้มข้น อาจทำให้คงตัวได้โดยการเติมเกลือและน้ำตาล (Rebeller, 1982)

สำหรับมอลโตเดกซ์ตริน (Maltodextrin) เป็นสารโพลิเมอร์ที่ประกอบด้วยโมเลกุลของกลูโคสต่อกันด้วยพันธะ α -1-4 มีค่า สมมูลย์เดกซ์โตรส (Dextrose equivalent) อยู่ระหว่าง 5-20 มีทั้งชนิดที่เป็นผง และสารละลายเข้มข้น ผลิตจากแป้งข้าวโพด แป้งมันฝรั่ง แป้งข้าว และแป้งมันสำปะหลัง โดยกระบวนการย่อยด้วยกรดหรือเอนไซม์ สำหรับมอลโตเดกซ์ตรินที่มีค่าสมมูลย์เดกซ์โตรสเท่ากับ 10 และมีความชื้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนัก จะมีค่า T_g ประมาณ 100 องศาเซลเซียส (Avaltroni, Bouquerand และ Normand, 2004) นิยมใช้เป็นสารช่วยในการทำแห้ง (Drying aid) สำหรับสารละลายที่มีกรดหรือน้ำตาลเป็นองค์ประกอบอยู่มาก เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นผงแห้งไม่เหนียว (Adhikari, Howes, Bhandari และ Troung, 2004)

2.12 การศึกษาคุณสมบัติของไฟโคไซยานิน

2.12.1 การศึกษาคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

วิธีการศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมี 6 วิธีหลัก ได้แก่ (1) Ferric reducing/antioxidant power (FRAP) assay (2) β -Carotene-linoleic acid model system (β -CLAMS) (3) Oxygen radical absorption capacity (ORAC) method (4) Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) method (5) Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) method และ (6) Photochemiluminescence (PCL) method (Tsao และ Deng, 2004)

สำหรับการศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของไฟโคไซยานินนิยมใช้วิธี TEAC วิธี TBARS [Estrada, Bescos และ Fresno (2001) และ Bhat และ Madyastha (2000)] และ Crocin bleaching assay (Bhat และ Madyastha, 2000)

การศึกษาความคงตัวของไขมันโดยผลของสารต้านอนุมูลอิสระสามารถใช้เครื่อง Rancimat ในการศึกษาโดยใช้ค่า Induction time บ่งชี้ความคงตัว ซึ่งเรียกว่า ค่าดัชนีความคงตัวของไขมัน หรือ Oil stability index เช่น การศึกษาความสามารถของสารสกัดจาก buckwheat ในการยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน (Sun และ Ho, 2005)

2.12.2 การคำนวณความเข้มข้นของไฟโคไซยานิน

การคำนวณค่าความเข้มข้นของไฟโคไซยานิน มีสูตรคำนวณค่อนข้างแตกต่างกัน แต่มีพื้นฐานคล้ายกัน กล่าวคือการคำนวณจากค่าการดูดกลืนแสงที่ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของไฟโคไซยานินและอัลโลไฟโคไซยานิน ดังนี้

2.12.2.1 จาก Patel, Mishra, Pawar และ Ghosh (2005) คำนวณด้วยสมการ

$$C-PC \text{ (mg/ml)} = [A_{620} - 0.474 (A_{652})] / 5.34$$

2.12.2.2 จาก Fujita และ Hattori (1960) คำนวณด้วยสมการ

$$C-PC \text{ (mg/ml)} = 0.198 (A_{620}) - 0.133 (A_{650}) - 0.0019(A_{565})$$

2.12.2.3 จาก Siegelman และ Kycia (1978) คำนวณด้วยสมการ

$$C-PC \text{ (mg/ml)} = [A_{615} - 0.474 (A_{652})] / 5.34$$

2.12.2.4 จาก Boussiba และ Richmond (1979) คำนวณด้วยสมการ

$$\% \text{Pure C-PC} = [A_{620}(10)(\text{represent})] / [(7.3)(\text{mg. sample wt})(\% \text{dry wt})]$$

$$\% \text{Crude C-PC} = [A_{620}(10)(\text{represent})] / [(3.39)(\text{mg. sample wt})(\% \text{dry wt})]$$

เมื่อ 7.3 คือค่าสัมประสิทธิ์การดูดกลืนแสง (Extinction coefficient) ของ

ไฟโคไซยานิน ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

10 คือปริมาตรทั้งหมดของสารละลายที่เตรียมได้

Represents คือค่าเทียบเท่าร้อยละมีค่าเป็น 100

2.12.3 การคำนวณค่าความบริสุทธิ์ของไฟโคไซยานิน

การบอกค่าความบริสุทธิ์ของไฟโคไซยานินนิยมบอกด้วยค่าสัดส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร (A_{620}/A_{280}) เนื่องจากที่ค่าความยาวคลื่นทั้งสองเป็นค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายไฟโคไซยานิน และของโปรตีนตามลำดับ (Rito-Palomares, Nuñez และ Amador, 2001) อัตราส่วนดังกล่าวบ่งบอกถึงสัดส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงของไฟโคไซยานินซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณของไฟโคไซยานิน และค่าการดูดกลืนแสงของโปรตีนซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณโปรตีนทั้งหมด

2.12.4 การศึกษาความคงตัวของไฟโคไซยานิน

ในการศึกษาความคงตัวของไฟโคไซยานิน สามารถใช้รูปแบบของการดูดกลืนแสงในช่วงความยาวคลื่นที่เป็นผลจากการจัดเรียงโมเลกุลของไฟโคไซยานินสำหรับติดตามการเปลี่ยนแปลงของไฟโคไซยานินที่ถูกทำให้เกิดการเสียสภาพทางธรรมชาติ เช่น โดยสารยูเรีย (Fukui และคณะ, 2004) การติดตามด้วยค่าการดูดกลืนแสงอาจทำในช่วงความยาวคลื่น 400–800 นาโนเมตร (Sarada, Pillai และ Ravishankar, 1999)

Schirmer, Bode และ Huber (1987) พบว่าการจัดเรียงโมเลกุลของไฟโคไซยานิน และไฟโคไซยานโนไบลินมีความสัมพันธ์กัน ซึ่งความสัมพันธ์ดังกล่าวสามารถบ่งชี้ได้ด้วยค่าสัดส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของไฟโคไซยานินในช่วงความยาวคลื่นที่ตามองเห็น (Visible) และช่วงคลื่นแสงสีม่วง (Ultraviolet) เช่นที่ 620 และ 370 นาโนเมตร ตามลำดับ เมื่อโมเลกุลของไฟโคไซยานินคลายตัวจะดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 370 นาโนเมตร ได้สูงขึ้น ในขณะที่เดียวกันไฟโคไซยานินในรูปปกติ (Native form) โมเลกุลของไฟโคไซยานโนไบลินจะถูกตรึงให้อยู่ในลักษณะคลีโมเลกุลเป็นแนวตรง (Extended conformational state) ซึ่งดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ได้สูงกว่าเมื่ออยู่ในรูปม้วนเป็นวง (Cyclic conformational state) หลังจากพันธะที่ยึดเหนี่ยวโมเลกุลของไฟโคไซยานินถูกทำลาย (Scheer และ Kufer, 1977)

2.13 รายการอ้างอิง

- Adhikari, B., Howes, T., Bhandari, B.R., and Troung, V. (2004) Effect of addition of maltodextrin on drying kinetics and stickiness of sugar and acid-rich foods during convective drying: experiments and modeling. **J. Food Engineering**. 62: 53–68.
- Adir, N. and Lerner, N. (2003). The crystal structure of a novel unmethylated form of C-Phycocyanin, a possible connector between cores and rods in phycobilisomes. **J. Bio Chem** .278(28): 25926-25932.
- Adir, N., Dobrovetsky, Y. and Lerner, N. (2001). Structure of C-Phycocyanin from the thermophilic cyanobacterium *Synechococcus vulcanus* at 2.5 angstroms: structural implications for thermal stability in phycobilisome assembly. **J. Mol. Biol.** 313: 71-81.
- Arakawa, T., Prestrelski, S.J., Kenney, W.C. and Carpenter, J.F. (2001). Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 46: 307-326.

- Avaltroni, F., Bouquerand, P.E. and Normand, V. (2004). Maltodextrin molecular weight distribution influence on the glass transition temperature and viscosity in aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**. 58: 323–334.
- Belay, A. (1997). **Mass culture of Spirulina outdoors –The Earthrise Farms experience**. In A. Vonshak (Ed). *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology* (pp. 131-158). London: Taylor and Francis.
- Benedetti, S., Benvenuti, F., Pagliarani, S., Francogli, S., Scoglio, S. and Canestrari, F. (2004). Antioxidant properties of a novel phycocyanin extract from the blue-green alga *Aphanizomenon flos-aquae*. **Life Sciences**. 75: 2353–2362.
- Berns, D.S. and MacColl, R. (1989). Phycocyanin in physical-chemical studies. **Chem. Rev.** 89: 807-825.
- Bhaskar, S.U., Gopalswamy, G. and Raghu, R. A. (2005). Simple method for efficient extraction and purification of C-Phycocyanin from *Spirulina platensis* Geitler. **Indian J. Experimental Biology**. 43(3): 277-279.
- Bhat, V. B. and Madyastha, K. M. (2000). C-Phycocyanin: A potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 275: 20-25.
- Bhat, V. B. and Madyastha, K. M. (2001). Scavenging of peroxynitrite by phycocyanin and phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: Protection against oxidative damage to DNA. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 285: 262–266.
- Biodelta. (2005). Deltablue™ - Phycocyanin. [On-line]. Available: <http://www.biodelta.net/phycocyanin.htm>
- Boosya Bunnag. (1995). **High-value Chemicals from Spirulina**. King Mongkut's University of Technology Thonburi.
- Boussiba, S. and Richmond, A. (1979). Isolation and characterization of phycocyanins from the blue-green alga *Spirulina platensis*. **Arch. Microbiol.** 120: 155-159.
- Ciferri, O. (1983). *Spirulina*, the edible microorganism. **Microbiol. Rev.** 47: 551-578.
- Costantino, H.R., Curley, J.G., Wu, S. and Hsu, C.C. (1998). Water sorption behavior of lyophilized protein–sugar systems and implications for solid-state interactions. **International J. Pharmaceutics**. 166: 211–221.

- Couteau, C., Baudry, S., Roussakis, C. and Coiffard, L.J.M. (2004). Study of thermodegradation of phycocyanin from *Spirulina platensis*. **Sciences des Aliments**. 24(5): 415-421.
- Cubiccioni, R.S. (1997). Phycobilisomes, derivatives, and uses therefore. **Patent number:** Us005695990A.
- Edwards, M.R., Hauer, C., Stack, R.F., Eisele, L.E. and MacColl, R. (1997). Thermophilic C-Phycocyanin: effect of temperature, monomer stability, and structure. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1321: 157-164.
- Edwards, M.R., MacColl, R. and Eisele, L.E. (1996). Some physical properties of an unusual C-Phycocyanin isolated from a photosynthetic thermophile. **Biochimica et Biophysica Acta**. 1276: 64-70.
- Estrada, J.E.P., Bescos, P.B. and Fresno, A.M.V.D. (2001). Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* protean extract. **Il Farmaco**. 56: 497–500.
- Fujita, Y., Hattori, A. (1960). Formation of phycoerythrin in pre-illuminated cells of *Tolypothrix tenuis* with special reference to nitrogen metabolism. **Plant Cell Physiol.** (1): 281-292.
- Fukui, K., Saito, T., Noguchia, Y., Kodera, Y., Matsushimaa, A., Nishimura, H. and Inada, Y. (2004). Relationship between color development and protein conformation in the PC molecule. **Dyes and Pigments**. 63: 89-94.
- Furuki, T., Maeda, S., Imajo, S., Hiroi, T., Amaya, T., Hirokawa, T., Ito, K. and Nozawa, H. (2003). Rapid and selective extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis* with ultrasonic cell disruption. **J. Applied Phycology**. 15(4): 319 - 324.
- Glazer, A.N. and Hixson, C.S. (1975). Characterization of R-Phycocyanin: chromophore content of R-Phycocyanin and C-Phycoerythrin. **J. Biological Chemistry**. 250(14): 5487-5495.
- Han, Byung-hoon, Pyo, Mi-Kyung, and Yang, Su-Jin. (2003). Denatured *Spirulina* and manufacturing method thereof. **International Publication Number:** WO 03/080811 A1.
- Hanzawa, H., Shinomura, T., Inomata, K., Kakiuchi, T., Kinoshita, H., Wada, K. and Furuya, M. (2002). Structural requirement of bilin chromophore for the photosensory specificity of phytochromes A and B. **PNAS**. 99(7): 4725-4729.
- Haque, I., Singha, R., Moosavi-Movahedi, A.A. and Ahmad, F. (2005). Effect of polyol osmolytes on ΔG_D , the Gibbs energy of stabilisation of proteins at different pH values. **Biophysical Chemistry**. 117: 1-12.

- Hatti-Kaul, R. and Mattiasson, B. (2003). **Release of Protein from Biological Host**. In R. Hatti-Kaul and Mattiasson (eds). **Isolation and Purification of Proteins** (pp: 1-27). USA: Marcel Dekker.
- Houghton, J.D. (2000). **Phycobilins**. In G.J. Lauro and F.J. Francis (eds). **Natural Food Colorants Science and Technology** (pp. 193-204). New York: Marcel Dekker.
- Jespersen, L., Stromdahl, L.D., Olsen, K. and Skibsted, L.H. (2004). Heat and light stability of three natural blue colorants for use in confectionery and beverages. **European Food Research and Technology**. 220(3-4): 261 – 266.
- Jiraporn Pusri. (1995). **Extraction of PC from *Spirulina* for Food Grade Colour**. Thesis Master of Science (Biotechnology), King Mongkut's University of Technology Thonburi, Thailand.
- Kao, O.H.W., Edwards, M.R. and Berns, D.S. (1975) Physical-chemical properties of C-Phycocyanin isolated from an acido-thermophilic eukaryote, *Cyanidium caldarium*. **J. Biochem.** 147: 63-70.
- MacColl, R. (1998). Cyanobacterial phycobilisomes. **J. structural biology**. 124: 311–334.
- Othes, S. and Pire, R. (2001). Fatty acid composition of *Chlorella* and *Spirulina* microalgae species. **J. AOAC Int.** 84: 1708-1714.
- Padyana, A.K., Bhat, V.B., Madyastha, K.M., Rajashankar, K.R. and Ramakumar, S. (2001). Crystal structure of a light-harvesting protein C-Phycocyanin from *Spirulina platensis*. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 282: 893–898.
- Parry Nutraceuticals. (2005). Phycocyanin. [On-line]. Available:
<http://www.parrynutraceuticals.com/special-offers/Phycocyanin/spec-offerings.asp>
- Patel, A., Pawar, R., Mishra, S., Sonawane, S. and Ghosh, P.K. (2004). Kinetic studies on thermal denaturation of C-Phycocyanin. **Indian J. Biochemistry and Biophysics**. 41(5): 254-257.
- Patel, A., Mishra, S., Pawar, R. and Ghosh, P.K. (2005). Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. **Protein Expression and Purification**. 40: 248 –255.
- Rezwan, M., Lanéelle M.A., Sander P. and Daff   M. (2007). Breaking down the wall: Fractionation of mycobacteria. **J. Microbiol Methods**. 68(1): 32-39.

- Rebeller, M., Yout, P., and Lonchamp, C. (1982). Process for selectively extracting dyestuffs contained in *Cyanophyceae* the so-extracted dyestuffs and their use, particularly in foodstuffs. **Patent number:** US04320050.
- Rito-Palomares, M., Nuñez, L. and Amador, D. (2001). Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for C-Phycocyanin recovery from *Spirulina maxima*. **J. Chemical Technology & Biotechnology**. 76(12): 1273–1280.
- Sarada, R., Pillai, M. G. and Ravishankar, G.A. (1999). Phycocyanin from *Spirulina sp*: influence of processing of biomass on phycocyanin yield, analysis of efficacy of extraction methods and stability studies on phycocyanin. **Process Biochemistry**. 34: 795–801.
- Scheer, H. and Kufer, W. (1977). Conformational studies on C-Phycocyanin from *Spirulina platensis*. **Z. Naturforsch.** 32C: 513-519.
- Schirmer, T., Bode, W. and Huber, R. (1987). Refined three-dimensional structures of two cyanobacterial C-Phycocyanin at 2.1 and 2.5 Å resolution: A common principle of phycocyanin-protein interaction. **J. Mol. Biol.** 196: 677-695.
- Siegelman, H.W. and Kycia, J. H. (1978). **Algal Biliproteins**. In J. A. Hellebust and J. S. Craigie (eds). **Handbook of Physiological and Biochemical Methods** (pp. 71-79). Cambridge: Cambridge University Press.
- Stec, B., Troxler, R.F. and Teeter, M.M. (1999) Crystal structure of C-Phycocyanin from *Cyanidium caldarium* provides a new perspective on phycobilisome assembly. **Biophysical Journal**. 76: 2912–2921.
- Sun, T. and Ho, C.-T.(2005). Antioxidant activities of buckwheat extracts. **Food Chemistry**. 90: 743–749.
- Tomaselli, L. (1997). **Morphology, Ultrastructure and Taxonomy of *Arthrospira (Spirulina) maxima* and *Arthrospira (Spirulina) platensis***. In A. Vonshak (ed). ***Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-biology and Biotechnology*** (pp. 1–16). London: Taylor and Francis.
- Tsao, R. and Deng, Z. (2004). Separation procedures for naturally occurring antioxidant phytochemicals. **J. Chromatography B**. 812: 85–99.
- Van Eykelenburg, C. (1977). On the morphology and ultrastructure of the cell wall of *Spirulina platensis*. **Antonie van Leeuwenhoek**. 43: 89-99.

- Van Eykelenburg, C. (1978). A glucan from the cell wall of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Antonie van Leeuwenhoek**. 44: 321-327.
- Viskari, P.J. and Colyer, C.L. (2003). Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria samples. **Analytical Biochemistry**. 319: 263–271.
- Vonshak, A. and Tomaselli, L. (2000). *Arthrospira (Spirulina): Systematics and ecophysiology*. In B.A. Whitton and M. Potts (eds). **The Ecology of Cyanobacteria** (pp. 505-522). Netherland: Kluwer Academic Publishers.
- Yoshui, F., Akiko, S. and Masaki, S. (2003). Method of extracting Phycocyanin from blue-green algae. **Patent number**: JP2003342489.
- Yoshui, F., Akiko, S. and Masaki, S. (2004). Method for purifying phycocyanin coloring matter liquid. **Patent number**: JP2004027041.
- Zhou, Z.-P., Liu, L.-N., Chen, X.-L., Wang, J.-X., Chen, M., Zhang, Y.-Z. and Zhou, B.C. (2005). Factors that effect antioxidant activity of C-Phycocyanin from *Spirulina platensis*. **J. Food Biochemistry**. 29(3): 313-322.

บทที่ 3

การคัดเลือกสายพันธุ์สาหร่ายสไปรูลินาสำหรับการสกัดไฟโคไซยานิน

3.1 บทคัดย่อ

สาหร่ายในสกุลสไปรูลินามีอยู่ด้วยกันหลายสายพันธุ์ ในการนำสาหร่ายในสกุลนี้มาใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดไฟโคไซยานินจึงต้องคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมที่สุด ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงศึกษาคุณสมบัติของสาหร่ายในสกุลสไปรูลินา 10 สายพันธุ์จากสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ได้แก่ *Spirulina platensis* (IFRPD 1178 1181 1190 1204 1208 1212 1213 และ 1216) และ *Spirulina maxima* (IFRPD 1183 และ 1215) เพื่อคัดสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อการนำไปใช้สกัดไฟโคไซยานิน โดยศึกษาลักษณะทั่วไปของเซลล์สาหร่าย ปริมาณไฟโคไซยานินทั้งหมด และผลผลิตของไฟโคไซยานินที่สกัดได้ โดยเลี้ยงสาหร่ายในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารเหลวสูตร Zarrouk เป็นเวลา 7 วัน พบว่า ความหนาของผนังเซลล์มีขนาดระหว่าง 46.80–164.80 นาโนเมตร ความยาวของไตรโคมอยู่ระหว่าง 192.10–321.19 ไมโครเมตร เส้นผ่านศูนย์กลางของเกลียวมีขนาดระหว่าง 21.00–39.92 ไมโครเมตร ระยะห่างช่วงเกลียวอยู่ระหว่าง 28.94–90.39 ไมโครเมตร และความหนาไตรโคมอยู่ระหว่าง 8.49–12.28 ไมโครเมตร และพบว่าทุกสายพันธุ์ มีอัตราการเจริญเติบโตไม่แตกต่างกัน แต่สายพันธุ์ 1183 และ 1213 มีปริมาณไฟโคไซยานินทั้งหมดสูงที่สุด (ร้อยละ 17.53 และ 17.14 ของน้ำหนักแห้งตามลำดับ) มีคุณสมบัติไม่แยกตัวจากอาหารที่ใช้เลี้ยงและทนต่อการถูกสกัดด้วยวิธีแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และการสกัดด้วยคลื่นอัลตราโซนิก ดังนั้นสายพันธุ์ 1183 และ 1213 จึงเป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสม

3.2 บทนำ

สาหร่ายสไปรูลินาเป็นสาหร่ายในสกุล *Spirulina* ชนิดที่เพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลาย คือ *Spirulina platensis* และ *Spirulina maxima* สาหร่ายสไปรูลินามีลักษณะโครงสร้างเป็นเซลล์ต่อกันหลายๆ เซลล์ประกอบขึ้นเป็นสายยาว (Multicellular structure) หรือเรียกว่าไตรโคม (Trichome cells) เส้นสาหร่ายเหล่านี้จะบิดตัวเป็นเกลียว ภายในเซลล์ประกอบด้วยกลุ่มของฟองอากาศเล็กๆ จำนวนมาก ซึ่งช่วยให้สาหร่ายสไปรูลินาสามารถลอยตัวในน้ำได้ (Ciferri, 1983) สายสาหร่ายสไปรูลินามีขนาดความหนาอยู่ในช่วง 6 ถึง 12 ไมโครเมตร แต่ละเซลล์จะมีรูปร่างเป็นรูป

ทรงกระบอก เกือบของ สาหร่ายมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 30 ถึง 70 ไมโครเมตร (Tomaselli, 1997) และแต่ละสาย มีความยาวประมาณ 500 ไมโครเมตร

สาหร่ายสไปรูลินามีโปรตีนร้อยละ 56 ถึงร้อยละ 77 ของน้ำหนักแห้ง (Ciferri, 1983) และมีไฟโคไซยานินคิดเป็นร้อยละ 40 ของโปรตีนทั้งหมดในเซลล์ (Zhou และคณะ, 2005) ซึ่งปริมาณดังกล่าวขึ้นกับสายพันธุ์ อายุของสาหร่าย ปริมาณไนโตรเจนในอาหารที่ใช้สำหรับเลี้ยงสาหร่าย (Ruengjitchatchawalya, Chirasuwan, Chaiklahan, Bunnag และ Tanticharoen [2002] และ Richmond, Vonshak และ Arad [1980]) และสถานะในการเลี้ยง เช่น อุณหภูมิ ค่าพีเอช อัตราการเติมอากาศและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นต้น (Becker และ Venkataraman, 1982) แต่การคัดเลือกพันธุ์สาหร่ายสไปรูลินาเพื่อการสกัดไฟโคไซยานินนั้น นอกจากจะพิจารณาที่ปริมาณไฟโคไซยานินทั้งหมดในเซลล์แล้ว ยังต้องพิจารณาถึงคุณสมบัติในการสกัดออกจากเซลล์ของสาหร่ายด้วย ซึ่งปริมาณของไฟโคไซยานินที่สกัดได้ขึ้นกับวิธีการสกัดและลักษณะโครงสร้างของเซลล์ ทั้งนี้ Gudín และ Therpenier (1986) รายงานว่าร้อยละ 20–30 ของต้นทุนการผลิตเป็นค่าใช้จ่ายในการเก็บเกี่ยวสาหร่าย และความสามารถในการลอยตัวของเซลล์ช่วยลดต้นทุนการเก็บเกี่ยวดังกล่าว (Kim และคณะ, 2005)

ดังนั้น เพื่อศึกษาสายพันธุ์สาหร่ายสไปรูลินาที่เหมาะสมต่อการนำไปสกัดไฟโคไซยานิน งานวิจัยในส่วนนี้จึงทำการคัดเลือกสายพันธุ์โดยพิจารณาจากลักษณะโครงสร้างของเซลล์ ปริมาณไฟโคไซยานินทั้งหมด และผลผลิตของการสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลินา โดยใช้พันธุ์สาหร่ายสไปรูลินาของสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร (Institute of Food Product Research and Development: IFRPD) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ จำนวน 10 สายพันธุ์

3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การเพาะเลี้ยงสาหร่าย

ศึกษาสาหร่ายสไปรูลินา 10 สายพันธุ์ จาก *Spirulina platensis* (IFRPD 1178 1181 1190 1204 1208 1212 1213 และ 1216) และ *Spirulina maxima* (IFRPD 1183 และ 1215) ของสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โดยเลี้ยงสาหร่ายในสูตรอาหาร Zarrouk ดังรายละเอียดในภาคผนวก ก (Zarrouk, 1966) ที่พีเอช 10.0 จำนวน 2 ชุดๆ ละ 3 ขั้ว โดยนำกล้าพันธุ์ที่เลี้ยงในสูตรอาหาร Zarrouk นาน 3 วัน ไปเลี้ยงในหลอดเลี้ยงสาหร่ายขนาด 200 มิลลิลิตร (คำนวณความเข้มข้นเริ่มต้นของสาหร่ายด้วยค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 560 นาโนเมตร (OD_{560}) ให้ได้เท่ากับ 0.5) ที่อุณหภูมิ 31 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน โดยเติมอากาศที่มีส่วนผสมของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 1.0 ในอัตรา 100 ลิตรต่อชั่วโมง และให้แสงสว่าง

ด้วยหลอดฟลูออเรสเซนต์ชนิดแสงขาววอล (Cool white fluorescent lamps) 3 หลอด (แต่ละหลอดมีกำลังและค่าความเข้มแสงเท่ากับ 36 วัตต์ และ 90–93 ลูเมนต่อวัตต์ ตามลำดับ) เป็นระยะเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน วัดอัตราการเจริญเติบโตด้วยการหาน้ำหนักแห้ง เมื่อครบเวลาตามที่กำหนด เก็บเกี่ยวสาหร่ายโดยกรองสาหร่ายด้วยผ้ากรองที่มีรูขนาด 35 ไมโครเมตร (Nylon mesh 140-T SWISS NYBOLT) ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง แล้วบรรจุในถุงพลาสติกก่อนเก็บในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส

3.3.2 สารเคมี

สารโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และโมโนโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ชนิดที่ใช้สำหรับงานวิเคราะห์ (ACS-for analysis grade) ผลิตโดยบริษัท Carlo Erba Reagenti ประเทศอิตาลี

3.3.3 การศึกษาขนาดและรูปร่างของสาหร่าย

วัดขนาดของสาหร่ายโดยวัดความยาวของไตรโคม เส้นผ่านศูนย์กลางของเกลียว (Helix diameter) ระยะช่วงเกลียว (Pitch length) และความหนาของไตรโคมด้วยกล้องจุลทรรศน์ Nikon microscope รุ่น Optiphot-2 ที่ประกอบด้วยกล้องดิจิทัล MEIJI 1/2" Color CCD Camera รุ่น MTV-62VIP และ PIXERA Studio software (Thai Microscopy Co., Ltd.) จำนวน 100 เซลล์ต่อตัวอย่าง (Bennett และ Bogard, 1973)

ศึกษาความหนาของผนังเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscope) หรือ TEM ตามวิธีของ (Holmgren และ Hostetter, 1971)

3.3.4 การสกัดไฟโคไซยานินเพื่อหาปริมาณไฟโคไซยานินทั้งหมด

สกัดไฟโคไซยานินโดยดัดแปลงจากวิธีของ Patel, Mishra, Pawar และ Ghosh (2005) โดยซังสาหร่ายสดให้ได้น้ำหนักแน่นอนในช่วง 200-300 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง (Centrifugal tube) ขนาด 45 มิลลิลิตร เติมสารละลาย โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (pH 7.0) ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ผสมและนำไปทำลายผนังเซลล์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก โดยใช้เครื่อง Ultrasonic processor รุ่น GE-100 ซึ่งให้คลื่นอัลตราโซนิกที่ความถี่ 20 กิโลเฮิร์ตซ์ โดยใช้ร่วมกับ Stepped microtip ขนาด 1/8 นิ้ว ซึ่งให้ค่าขนาดความสูงของคลื่นสูงสุด 211 ไมโครเมตร นาน 1 นาที ที่ขนาดความสูงของคลื่น (Amplitude) ร้อยละ 5 (2 วัตต์) พร้อมกับหล่อเย็นด้วยน้ำแข็งตลอดเวลา จากนั้นนำไปแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สลับกับการละลายน้ำแข็งที่อุณหภูมิห้อง ทำ 3 รอบแล้วนำไปแช่ที่อุณหภูมิห้องนาน 4 ชั่วโมง แล้วเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง ก่อนนำไปปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่อง Hettich Zentrifugen รุ่น Universal 16R ที่ 15 องศาเซลเซียส ที่ 13,500 RCF นาน 20 นาที

นำของเหลวสีฟ้าที่ได้มาเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่า 1.0 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Biochrom รุ่น Libra S22 UV/VIS spectrophotometer โดยกราฟความยาวคลื่นด้วยโปรแกรม Acquire Wavescan รุ่น 1.01 ในช่วง 250 – 750 นาโนเมตร โดยใช้ Cuvette แบบควอตซ์ (quartz cell) ขนาดกว้าง 1 เซนติเมตร คำนวณปริมาณไฟโคไซยานินและค่าความบริสุทธิ์ จากสมการข้างล่าง (Patel และคณะ, 2005)

$$\text{ปริมาณไฟโคไซยานิน (มก./มล.)} = [A_{620} - 0.474 A_{652}] / 5.34$$

$$\text{ความบริสุทธิ์} = A_{620} / A_{280}$$

3.3.5 ผลผลิตของไฟโคไซยานิน

ศึกษาความสามารถในการให้ผลผลิตไฟโคไซยานินเมื่อนำสาหร่ายไปสกัดด้วยวิธีสกัดที่แตกต่างกัน 2 วิธีคือ วิธีที่ 1 สกัดด้วยการแช่เยือกแข็งสลับกับการละลาย และวิธีที่ 2 สกัดโดยใช้คลื่นอัลตราโซนิก

3.3.5.1 การสกัดด้วยวิธีการแช่เยือกแข็งสลับกับการละลาย

สำหรับวิธีการสกัดด้วยการแช่เยือกแข็งทำโดยผสมตัวอย่างสาหร่ายสด 200-300 กรัมในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.0) ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ปริมาณ 1 มิลลิตร แล้วนำไปแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง และละลายน้ำแข็งที่อุณหภูมิห้อง ทำ 3 รอบ จากนั้นเติมสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ อีก 9 มิลลิตร นำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 4 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Hettich Zentrifugen รุ่น Universal 16R ที่ 15 องศาเซลเซียส ที่ 13,500 RCF นาน 20 นาที จากนั้นนำส่วนของของเหลวสีฟ้าจากการสกัดครั้งเดียวไปหาปริมาณไฟโคไซยานินด้วยวิธีการเดียวกับการหาปริมาณไฟโคไซยานินทั้งหมด

3.3.5.2 การสกัดโดยใช้คลื่นอัลตราโซนิก

โดยผสมตัวอย่างสาหร่ายสด 200-300 มิลลิกรัม ในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.0) ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ปริมาณ 10 มิลลิตร แล้วนำไปสลายเซลล์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกเช่นเดียวกับที่ใช้ในข้อ 3.3.4 นาน 1 นาที ที่ขนาดความสูงของคลื่นร้อยละ 5 (2 วัตต์) พร้อมกับหล่อเย็นด้วยน้ำแข็งตลอดเวลา แล้วนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิห้องนาน 4 ชั่วโมง ก่อนนำไปปั่นแยกเซลล์และหาปริมาณไฟโคไซยานินเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 3.3.5.1

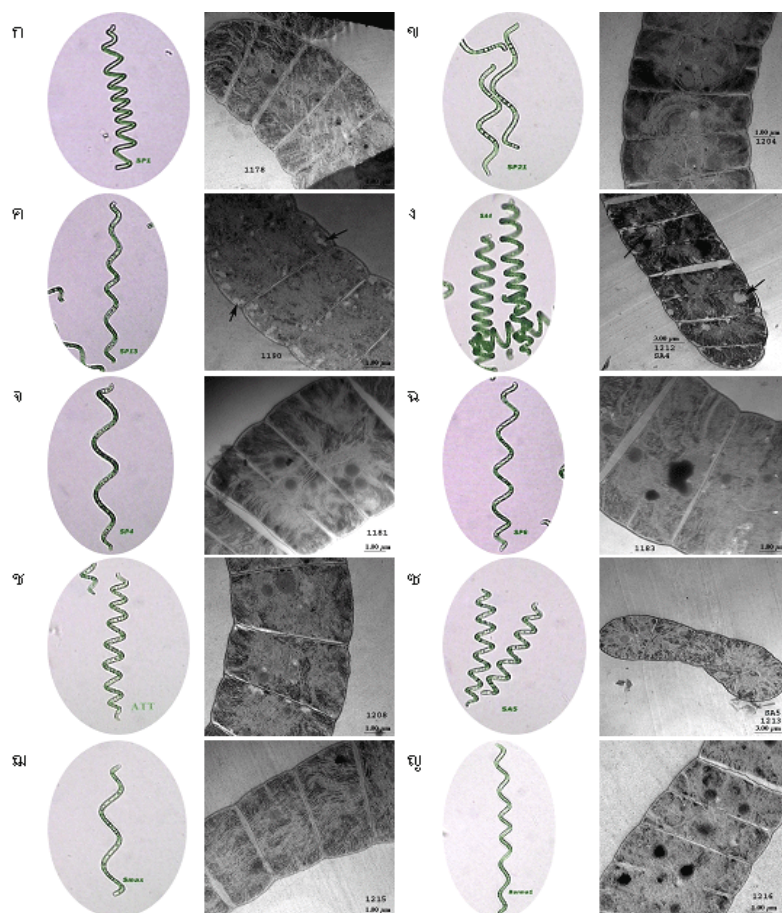
3.3.6 สถิติและแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ คำนวณค่าการทดลองในรูปค่าเฉลี่ย ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานและความแปรปรวน

3.4 ผลการทดลองและการอภิปรายผล

3.4.1 ลักษณะทั่วไปของสาหร่ายสไปรูลีนา

เมื่อนำสาหร่ายที่เลี้ยงในสารละลาย Zarrouk ไปตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 1 ชั่วโมง พบว่าสายพันธุ์ 1178 และ 1204 (ภาพที่ 3.1ก และ ข) จะตกตะกอนทั้งหมด ในขณะที่สายพันธุ์ 1190 และ 1212 (ภาพที่ 3.1ค และ ง) เซลล์จะรวมกลุ่มและลอยตัวที่ผิวของสารละลาย จากภาพดังกล่าวพบว่าไม่ปรากฏฟองอากาศ (Gas vacuole) ภายในเซลล์ของสายพันธุ์ 1178 และ 1204 แต่ปรากฏฟองอากาศจำนวนมากในเซลล์ของสายพันธุ์ 1190 และ 1212 ซึ่งส่งผลให้สาหร่ายสามารถลอยตัว ส่วนสาหร่ายอีก 6 สายพันธุ์ที่เหลือจะพบฟองอากาศจำนวนไม่มาก และพบว่าในกลุ่มนี้จะแขวนลอยอยู่ในสารละลาย Zarrouk โดยไม่ลอยตัวหรือตกตะกอน



ภาพที่ 3.1 ไตรโคมของสาหร่ายสไปรูลีนา (กำลังขยาย 20 เท่า) และเซลล์ของสาหร่ายสไปรูลีนา

จากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน: IFRPD 1178 (ก), 1204 (ข), 1190 (ค), 1212 (ง), 1181(จ), 1183 (ฉ), 1208 (ช), 1213 (ซ), 1215 (ฌ), และ 1216 (ญ); ลูกศรสีดำชี้ฟองอากาศภายในเซลล์สาหร่ายสไปรูลีนา

ดังนั้นการเลี้ยงสาหร่ายสายพันธุ์ที่จิม เช่น สาหร่ายสปรูไลนา 1178 ในเชิงอุตสาหกรรมนั้น หากเลี้ยงสายพันธุ์เดียวกันๆ จะพบปัญหาการรวมกลุ่มแยกตัวจากสารละลายที่ใช้เลี้ยง ส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตและการตายของสาหร่ายเอง

3.4.2 มิติของเซลล์สาหร่าย

จากตารางที่ 3.1 และภาพที่ 3.1 พบว่า ในด้านความหนาของผนังเซลล์ของสายพันธุ์ 1212 มีผนังเซลล์หนาที่สุด ในขณะที่สายพันธุ์ 1216 มีผนังเซลล์บางที่สุด ไตรโคมของสายพันธุ์ 1183 มีความยาวมากที่สุด ในขณะที่ไตรโคมของสายพันธุ์ 1213 มีขนาดสั้นที่สุด ด้านขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเกลียว พบว่าสายพันธุ์ 1208 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเกลียวสูงสุดในขณะที่สายพันธุ์ 1216 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเกลียวสั้นที่สุด ด้านระยะห่างร่องเกลียว พบว่าสายพันธุ์ 1181 มีความยาวของระยะห่างร่องเกลียวสูงสุดในขณะที่สายพันธุ์ 1213 มีความยาวของระยะห่างร่องเกลียวสั้นที่สุด ด้านความหนาของไตรโคม พบว่า สายพันธุ์ 1215 มีความหนาของไตรโคมสูงสุด ในขณะที่สายพันธุ์ 1213 มีความหนาต่ำที่สุด ขนาดของมิติต่างๆ เหล่านี้มีผลต่อคุณสมบัติในการกรองสาหร่ายออกจากน้ำที่ใช้ในการเลี้ยงและการล้างสาหร่ายระหว่างเก็บเกี่ยว โดยเฉพาะสายพันธุ์ 1213 ซึ่งมีขนาดเล็กจะกรองได้ยากกว่าสายพันธุ์ที่มีขนาดใหญ่ เช่น 1183

3.4.3 อัตราการเจริญเติบโตและผลผลิต

จากตารางที่ 3.2 พบว่าสายพันธุ์สปรูไลนา 1183 มีปริมาณไฟโคไซยานินทั้งหมดสูงสุดในขณะที่สายพันธุ์ 1212 มีปริมาณไฟโคไซยานินทั้งหมดต่ำที่สุด แต่อัตราการเจริญเติบโตและอัตราผลผลิตของสปรูไลนาทุกสายพันธุ์ไม่แตกต่างกันทางสถิติ

3.4.4 ความสามารถในการสกัดไฟโคไซยานิน

จากตารางที่ 3.3 พบว่าสาหร่ายสปรูไลนาแต่ละสายพันธุ์ให้ไฟโคไซยานินได้แตกต่างกัน โดยที่สายพันธุ์ 1190 1216 1178 1208 1212 และ 1213 สามารถสกัดได้มากกว่าร้อยละ 85 ของปริมาณไฟโคไซยานินทั้งหมดที่สกัดได้ด้วยวิธีการแช่เยือกแข็ง แต่มีเพียงสายพันธุ์ 1190 เท่านั้นที่สามารถสกัดได้มากกว่าร้อยละ 85 ของปริมาณไฟโคไซยานินทั้งหมดเมื่อสกัดด้วยการใช้คลื่นอัลตราโซนิก แต่อย่างไรก็ตามความสามารถในการให้ผลผลิตไฟโคไซยานินเมื่อนำไปสกัดดังกล่าวไม่สัมพันธ์กับความหนาของผนังเซลล์ในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 มิติของเซลล์สำหรับสายโปรไลนา

สายพันธุ์	ความหนาของผนังเซลล์ (นาโนเมตร)	มิติของไตรโคม (ไมโครเมตร)			
		ความยาวของไตรโคม	เส้นผ่านศูนย์กลางของเกลียว	ระยะห่างร่องเกลียว	ความหนาของไตรโคม
1178	40.73±3.67 ^b	217.56±20.31 ^e	32.66±1.18 ^d	40.10±2.85 ^g	10.26±0.67 ^{cd}
1181	37.39±4.10 ^{cd}	279.6±23.74 ^{bc}	38.40±2.93 ^b	90.40±6.37 ^a	11.00±0.75 ^b
1183	35.36±3.58 ^{de}	321.19±31.69 ^a	35.94±2.08 ^c	68.22±4.52 ^d	10.16±0.79 ^{cd}
1190	38.84±2.91 ^{bc}	284.77±29.09 ^{bc}	23.83±1.33 ^g	49.14±3.72 ^e	9.98±1.17 ^d
1204	39.22±4.38 ^{bc}	241.20±28.90 ^d	31.15±2.32 ^e	86.80±6.44 ^b	9.38±0.60 ^e
1208	36.95±2.74 ^{cd}	292.19±38.35 ^b	39.92±1.94 ^a	36.71±2.24 ^h	10.91±1.11 ^b
1212	63.27±7.20 ^a	275.81±33.04 ^c	38.59±1.60 ^b	35.43±2.05 ^h	10.51±0.88 ^c
1213	64.64±8.24 ^a	193.10±26.15 ^f	26.78±1.32 ^f	28.94±1.18 ⁱ	8.49±0.59 ^f
1215	33.06±3.70 ^c	243.08±32.31 ^d	36.33±2.88 ^c	81.79±12.17 ^c	12.28±1.46 ^a
1216	38.11±3.69 ^c	276.80±38.28 ^c	21.00±2.32 ^h	46.54±4.06 ^f	9.42±0.59 ^e

* ตัวอักษรที่เหมือนกันในแถวตอนเดียวกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (p< 0.05)

ตารางที่ 3.2 อัตราเจริญเติบโตและผลผลิตของสำหรับสายโปรไลนา

สายพันธุ์	อัตราเจริญเติบโต ^{ns} (มิลลิกรัมต่อชั่วโมง)	ผลผลิตสำหรับ ^{ns} (กรัมต่อลิตร)	ปริมาณไฟโคไซยานินทั้งหมด* (ร้อยละของน้ำหนักแห้ง)
1178	13.67±2.69	2.30±0.45	17.69 ^a
1181	14.44±2.34	2.43±0.39	14.04 ^c
1183	13.79±2.41	2.32±0.41	17.53 ^a
1190	15.01±2.68	2.52±0.45	15.50 ^{cde}
1204	14.48±1.06	2.43±0.18	16.89 ^{abc}
1208	13.40±1.83	2.25±0.31	15.91 ^{bcd}
1212	14.14±1.68	2.37±0.28	14.58 ^{de}
1213	14.41±3.30	2.42±0.55	17.14 ^{ab}
1215	14.96±3.31	2.51±0.56	14.86 ^{de}
1216	13.24±2.66	2.22±0.45	16.67 ^{abc}

* ตัวอักษรที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05)

ตารางที่ 3.3 ไฟโคไซยานินที่สกัดได้เป็นร้อยละของไฟโคไซยานินทั้งหมด

วิธีสกัด	IFRPD									
	1178	1181	1183	1190	1204	1208	1212	1213	1215	1216
วิธีที่ 1	99.2 ^a	39.5 ^{cd}	62.8 ^b	102.8 ^a	23.7 ^d	88.1 ^a	87.9 ^a	87.2 ^a	45.5 ^{bc}	105.1 ^a
วิธีที่ 2	50.2 ^c	15.0 ^{de}	10.3 ^c	102.9 ^a	9.7 ^c	16.7 ^{de}	23.9 ^d	14.2 ^{de}	15.9 ^{de}	76.2 ^b

* $p < 0.05$

ในขั้นตอนการเก็บเกี่ยวสาหร่ายสำหรับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม มักนำสาหร่ายซึ่งแขวนลอยในสารละลายไปกรองโดยการสูบล้างด้วยเครื่องสูบน้ำ ซึ่งการกระทำดังกล่าวมักมีผลทำให้เส้นสาหร่ายเกิดความเสียหาย (Vonshak, 1997) ดังนั้นเซลล์ที่ถูกสกัดได้ง่ายอาจได้รับความเสียหายในระหว่างขั้นตอนดังกล่าวได้มากกว่า ทำให้ผลผลิตลดลง

3.4.5 คุณสมบัติของไฟโคไซยานิน

ในกลุ่มสายพันธุ์ที่สามารถสกัดไฟโคไซยานินได้ง่าย พบว่าไฟโคไซยานินที่สกัดได้ มีค่าความบริสุทธิ์มากกว่า 1.0 (ตารางที่ 3.4) ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายไฟโคไซยานินจากทุกสายพันธุ์มีค่าอยู่ที่ช่วงคลื่นระหว่าง 619.8–621.3 นาโนเมตร (ตารางที่ 3.5) สอดคล้องกับรายงานของ MacColl (1998) ซึ่งพบว่าไฟโคไซยานินที่สกัดจากสาหร่ายในกลุ่มไซยาโนแบคทีเรีย จะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุด ที่ 621 นาโนเมตร

ตารางที่ 3.4 ค่าความบริสุทธิ์ของไฟโคไซยานินที่สกัดได้จากสาหร่ายสไปรูลีนา 10 สายพันธุ์

วิธีสกัด	สายพันธุ์									
	1178	1181	1183	1190	1204	1208	1212	1213	1215	1216
วิธีที่ 2+ วิธีที่ 1 ⁽¹⁾	1.07	1.13	1.15	1.04	1.24	1.09	0.94	1.08	1.16	1.09
วิธีที่ 1	1.38	1.01	1.16	1.28	0.91	1.25	1.12	1.26	1.12	1.33
วิธีที่ 2	1.21	0.80	0.60	1.28	0.88	0.74	0.65	0.71	1.01	1.28

⁽¹⁾ วิธีที่ใช้สกัดหาปริมาณไฟโคไซยานินทั้งหมด

ตารางที่ 3.5 ความยาวคลื่นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายไฟโคไซยานินที่สกัดได้

ค่าวิเคราะห์	สายพันธุ์									
	1178	1181	1183	1190	1204	1208	1212	1213	1215	1216
ค่าเฉลี่ย ^{ns} (นาโนเมตร)	620.3	619.8	620.4	621.3	620.4	620.4	620.8	620.7	620.8	620.6
ค่าเบี่ยงเบน มาตรฐาน (S.D.)	0.26	0.86	0.40	0.55	0.97	0.31	0.87	0.20	0.25	0.17

^{ns} ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

3.5 สรุปผลการวิจัย

สำหรับสไปรูลีนาทั้ง 10 สายพันธุ์สามารถจำแนกได้เป็น 3 กลุ่มตามปริมาณฟองอากาศภายในเซลล์ซึ่งมีผลต่อคุณสมบัติในการแขวนลอยในสารละลายที่ใช้เลี้ยงสาหร่าย ได้แก่ กลุ่มที่มีฟองอากาศน้อย กลุ่มที่มีฟองอากาศปานกลาง และกลุ่มที่มีฟองอากาศมาก เมื่อพิจารณาจากปริมาณไฟโคไซยานินทั้งหมดจะพบว่าสายพันธุ์สไปรูลีนา 1178 1183 1213 และ 1216 เหมาะสมต่อการนำไปสกัดมากที่สุด แต่สายพันธุ์ 1178 จะรวมกลุ่มตกตะกอนในสารละลายที่ใช้เลี้ยง ดังนั้นสายพันธุ์ 1178 จึงอาจไม่เหมาะสมต่อการนำไปเพาะเลี้ยงเพื่อสกัดไฟโคไซยานิน

แต่อย่างไรก็ตาม ผลจากการสกัดด้วยวิธีการแช่เยือกแข็งสลับกับการละลาย และวิธีการใช้คลื่นอัลตราโซนิคชี้ให้เห็นว่าสายพันธุ์ 1213 และ 1183 นั้นสามารถทนต่อวิธีการสกัดด้วยวิธีทั้งสองได้ดีกว่าสายพันธุ์ 1216 ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวเป็นผลดีต่อการเก็บเกี่ยวในระดับการผลิตเชิงอุตสาหกรรม ซึ่งต้องผ่านขั้นตอนที่ต้องได้รับแรงกระทำก่อนเข้าสู่กระบวนการสกัด เช่น แรงเฉือนจากเครื่องสูบน้ำ ซึ่งจะช่วยลดการสูญเสียไฟโคไซยานินไปในระหว่างกระบวนการผลิตขั้นต้นได้ดีกว่า แต่อย่างไรก็ตาม หากสามารถออกแบบกระบวนการผลิตขั้นต้นดังกล่าวให้มีผลต่อการทำลายผนังเซลล์น้อยที่สุดหรือไม่มีผลเลย สายพันธุ์ 1216 ก็จะเป็นตัวเลือกที่เหมาะสมเมื่อพิจารณาคุณสมบัติด้านความสามารถในการสกัดซึ่งทำได้ง่ายกว่า และสามารถออกแบบวิธีการสกัดที่มีต้นทุนการผลิตต่ำกว่า

ดังนั้นในขั้นการทำลองนี้จึงเลือกสายพันธุ์ 1183 และ 1213 เพื่อนำศึกษาประสิทธิภาพในการสกัดไฟโคไซยานินในส่วนต่อไป

3.6 รายการอ้างอิง

- Becker, E.W. and Venkataraman, L.V. (1982). **Biotechnology and exploitation of algae: the Indian approach**. Deutsche Gesellschaft fur Technische Zusammenarbeit. Germany.
- Bennett, A. and Bogard, L. (1973). Complementary chromatic adaptation in a filamentous blue-green alga. **J. cell biology**. 58: 419 -435.
- Ciferri, O. (1983). *Spirulina*, the edible microorganism. **Microbiol. Rev.** 47: 551-578.
- Gudin, C. and Therpenier, C. (1986). Bioconversion of solar energy into organic chemicals by microalgae. **Advances in Biotechnological Processes**. 6: 73–110.
- Holmgren, P.R. and Hostetter, H.P. (1971). Ultrastructural observation of crosswalls in the blue-green alga *Spirulina major*. **J. Phycol.** 7: 309-311.
- Kim, S.-G., Choi, A., Ahn, C.-Y., Park, C.-S., Park, Y.-H. and Oh, H.-M. (2005). Harvesting of *Spirulina platensis* by cellular flotation and growth stage determination. **Letters in Applied Microbiology**. 40: 190–194.
- MacColl, R. (1998). Cyanobacterial phycobilisomes. **J. structural biology**. 124: 311–334.
- Patel, A., Mishra, S., Pawar, R. and Ghosh, P.K. (2005). Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. **Protein Expression and Purification**. 40: 248–255.
- Richmond, A., Vonshak, A. and Arad, S.M. (1980). **Environmental Limitations in Outdoor Production of Algal Biomass**. In G. Shelef and C.J. Soeder (eds). **Algae Biomass** (pp: 65-72). Amsterdam: Elsevier /North Holland Biomedical Press.
- Ruengjitchawalya, M., N. Chirasuwan, R. Chaiklahan, B. Bunnag and Tanticharoen, M. (2002). Photosynthetic characterization of a mutant of *Spirulina platensis*. **J. Appl. Phycol.** 14: 71-76.
- Tomaselli, L. (1997). **Morphology, Ultrastructure and Taxonomy of *Arthrospira (Spirulina) maxima* and *Arthrospira (Spirulina) platensis***. In A. Vonshak (ed). ***Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, Cell-biology and Biotechnology*** (pp. 1 – 16). London: Taylor and Francis.
- Vonshak, A. (1997). ***Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology***. London: Taylor & Francis.

- Zarrouk, C. (1966). **Contribution Aletude Dune *Cyanophyceae*: Influnce de Divers Facteurs Physiques et Chimiques sur la Croissance et la Photosynthese de *Spirulina maxima*.** PhD. Thesis, Paris.
- Zhou, Z.-P., Liu, L.-N., Chen, X.-L. , Wang, J.-X., Chen, M., Zhang, Y.-Z. and Zhou, B.-C. (2005). Factors that effect antioxidant activity of C-Phycocyanin from *Spirulina platensis*. **J. Food Biochemistry**. 29(3): 313-322.

บทที่ 4

การศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลินา

4.1 บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ทำการศึกษาวิธีการสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลินาจากสาหร่าย 2 สายพันธุ์ คือ *Spirulina platensis* (IFRPD1213) และ *Spirulina maxima* (IFRPD1183) โดยศึกษาวิธีการสกัดโดยทำลายผนังเซลล์ 3 วิธี คือ (1) การใช้คลื่นอัลตราโซนิก (2) การแช่เยือกแข็งสลับกับการละลาย (Repeatedly Freezing and Thawing, RFT) และ (3) การย่อยด้วยไลโซไซม์ เพื่อสกัดไฟโคไซยานิน โดยวิธีที่ (1) ทำลายผนังเซลล์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกเป็นเวลา 5, 12.5 และ 20 วินาที ที่ระดับความสูงของคลื่นร้อยละ 70, 85 และ 100 ส่วนวิธีที่ (2) ใช้การแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 1-3 ชั่วโมง สลับกับการละลาย 1-3 รอบ และในวิธีที่ (3) ใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 9.09 และ 18.17 มิลลิกรัมต่อกรัมของสาหร่าย (น้ำหนักแห้ง) โดยสกัดที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 44 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-4 ชั่วโมง พบว่า คลื่นอัลตราโซนิกจะสามารถทำลายผนังเซลล์สาหร่ายทั้งสองสายพันธุ์ ได้ดีกว่าวิธี RFT หลังจากทำลายผนังเซลล์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกเมื่อนำไปสกัดต่อพบว่า ที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลาสกัดมีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดของทั้งสองสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ประสิทธิภาพการสกัดของทั้งสองสายพันธุ์ที่อุณหภูมิเท่ากันไม่แตกต่างกัน การสกัดสายพันธุ์ 1183 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะให้ค่า EE สูงกว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่เวลาสกัดเท่ากัน จากการสกัดด้วยวิธีที่ (3) พบว่าระยะเวลาและอุณหภูมิในการสกัดมีผลต่อประสิทธิภาพการสกัด และ A440 ของทั้งสองสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ปริมาณไลโซไซม์มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดของสายพันธุ์ 1213 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แต่ไม่มีผลต่อ 1183 และพบว่าตัวอย่างที่ใช้เอนไซม์ ให้ค่า EE สูงกว่าเมื่อสกัดด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพียงอย่างเดียวเพียงร้อยละ 6.4 สำหรับสายพันธุ์ 1213 และการสกัดด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพียงอย่างเดียวที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงกว่าการสกัดด้วยน้ำอาร์โอถึง 13 เท่า

4.2 บทนำ

โครงสร้างเซลล์ของสาหร่ายสไปรูลินามีโครงสร้างคล้ายกับเซลล์ของแบคทีเรียในกลุ่มโปรคาริโอตซึ่งผนังเซลล์ไม่ติดสีแกรม (Gram-negative) อวัยวะทั้งหมดของเซลล์รวมถึงเยื่อ

ไทลาคอยด์ จะกระจายอยู่ภายในเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม ซึ่งเมื่อเยื่อหุ้มดังกล่าวแตกหรือฉีกขาด ไฟโคไซยานินซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของเยื่อไทลาคอยด์จะถูกปลดปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์ได้ เยื่อหุ้มไซโตพลาสซึมของสาหร่ายสไปรูลินามีโครงสร้าง 4 ชั้นตามแนวยาวของไตรโคม (Van Eykelenburg, 1977) เยื่อหุ้มชั้นนอกสุด (layer IV) ประกอบด้วย Lipopolysaccharides (LPS) ซึ่งแต่ละโมเลกุลของ LPS จะเชื่อมต่อกันด้วยแคลเซียมและแมกนีเซียม ส่วนชั้นถัดไป (Layer III) เป็นชั้นของเส้นใยโปรตีน (Ciferri, 1983) สำหรับ ชั้นที่สอง (Layer II) ซึ่งเป็นชั้นที่แข็งแรงที่สุด ประกอบด้วย เพปติโดไกลแคน และชั้นในสุด (Layer I) มี β -1,2-glucan เป็นองค์ประกอบหลัก (Van Eykelenburg, 1978)

การทำลายผนังเซลล์สามารถทำได้หลายวิธี แต่สามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ (1) การใช้แรงกล เช่น เครื่องบด คลื่นอัลตราโซนิก และการใช้แรงดันสูง (2) การทำลายทางกายภาพ เช่น ความร้อน หรือการแช่เยือกแข็งสลับกับการละลาย 2 ถึง 3 รอบ และ (3) การย่อยด้วยเอนไซม์หรือสารเคมี (Hatti-Kaul และ Mattiasson, 2003)

คลื่นอัลตราโซนิกจะทำลายผนังเซลล์ได้โดยแรงกระแทกและแรงเฉือนจากพลังของคลื่นเสียงและจากแรงดันของฟองอากาศภายในเซลล์ที่เกิดจากคลื่นอัลตราโซนิก แต่วิธีการแช่เยือกแข็งสลับกับการละลาย ผนังเซลล์จะเกิดการฉีกขาดโดยคมของผลึกน้ำแข็งที่ขยายตัวระหว่างกระบวนการแช่เยือกแข็งสลับกับการละลาย

สารเคมีที่มีคุณสมบัติในการทำลายผนังเซลล์ที่นิยมใช้ ได้แก่ อีดีทีเอ (EDTA) โดยการดึงอนุมูลแคลเซียมและอนุมูลแมกนีเซียมออกจากชั้นของ LPS สารชะล้าง (Detergent) เช่น Triton X-100 หรือโซเดียมฟอสเฟตสามารถทำลายชั้น LPS ได้โดยปฏิกิริยาการเปลี่ยนเป็นสบู่ (Hatti-Kaul และ Mattiasson, 2003) แต่กรณีของไลโซไซม์จะจำเพาะต่อการย่อยชั้นเพปติโดไกลแคน ซึ่งจะมีประสิทธิภาพสูงขึ้นเมื่อใช้ร่วมกับสารอีดีทีเอ แต่สำหรับสาหร่ายสไปรูลินา ไลโซไซม์จะให้ผลไม่ดีนัก (Yi และคณะ, 2005) แต่ก็สามารถใช้แรงกลช่วยเสริมประสิทธิภาพได้ (Rezwan และคณะ, 2007)

อย่างไรก็ตามวิธีการสกัดไฟโคไซยานินจากรายงานการวิจัยส่วนใหญ่เป็นวิธีการสกัดสำหรับเตรียมตัวอย่างเพื่อการวิเคราะห์ ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการสกัดที่เหมาะสมต่อการผลิตไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสไปรูลินา เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม โดยศึกษาวิธีการสกัด 3 วิธี คือ การใช้คลื่นอัลตราโซนิก RFT และการใช้ไลโซไซม์

4.3 วิธีดำเนินการวิจัย

4.3.1 สารเคมี และเอนไซม์

สารไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และโมโนโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตชนิดที่ใช้สำหรับงานวิเคราะห์ (ACS-for analysis grade) ผลิตโดยบริษัท Carlo Erba Reagenti ประเทศอิตาลี

ไลโซไซม์ชนิดสกัดจากไข่ขาวของไข่ไก่ ผลิตโดยบริษัท Sigma Chemical Company ประเทศสหรัฐอเมริกา (Product number L6876)

4.3.2 พันธุ์สาหร่ายสไปรูลินา

ใช้สกุลสาหร่าย *Spirulina platensis* (IFRPD1213) และ *Spirulina maxima* (IFRPD1183) โดยเลี้ยงสาหร่ายด้วยสูตรอาหาร Zarrouk (Zarrouk, 1966) ในอ่างเลี้ยงสาหร่ายกลางแจ้ง (Outdoor raceway pond) ขนาด 380 ลิตร ค่าพีเอช 10.0 เป็นเวลา 10 วัน

ทำการเก็บเกี่ยวสาหร่ายโดยกรองด้วยผ้ากรองไนลอนขนาดรู 35 ไมโครเมตร (140-T Swiss Nybolt) ล้าง 2 ครั้งด้วยน้ำสะอาด แล้วรีดให้สะเด็ดน้ำ จากนั้นนำไปบรรจุในถุงพลาสติกชนิดเย็น ถุงละ 40 กรัม รีดให้มีความหนาไม่เกิน 5 มิลลิเมตร ก่อนนำไปแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียสเพื่อรอการนำไปใช้

4.3.3 การสกัดไฟโคไซยานินเพื่อหาปริมาณไฟโคไซยานินทั้งหมด

ชั่งสาหร่ายสดให้ได้น้ำหนักแน่นอน 200-300 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 45 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นละลาย โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7.0) ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร ปริมาณ 10 มิลลิลิตร นำไปแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง และละลายน้ำแข็งที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง ทำ 3 รอบแล้วนำเข้าเครื่องเขย่าที่หล่อเย็นด้วยน้ำแข็งนาน 4 ชั่วโมง แล้วเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง เขย่าให้เข้ากันดีแล้วดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง ขนาด 2.5 มิลลิลิตร ก่อนนำไปเหวี่ยงแยกตกตะกอนด้วยเครื่อง ALC multispeed refrigerated centrifuge รุ่น PK121R นาน 30 นาที ที่ 15,826 RCF อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส

นำของเหลวใสสีฟ้าที่ได้มาเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัดให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่า 1.0 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Biochrom รุ่น Libra S22 UV/VIS Spectrophotometer วัดค่าโดยการกวาดช่วงคลื่นด้วยโปรแกรม Acquire wavescan รุ่น 1.01 ระหว่าง 250–750 นาโนเมตร โดยใช้ Cuvette แบบควอตซ์ ขนาดกว้าง 1 เซนติเมตร จำนวนปริมาณไฟโคไซยานิน ตาม Patel และคณะ (2005) ดังนี้

$$\text{ปริมาณไฟโคไซยานิน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = [A_{620} - 0.474 A_{652}] / 5.34$$

4.3.4 การศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการสกัดไฟโคไซยานิน

4.3.4.1 การทำลายผนังเซลล์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก

เตรียมตัวอย่างสาหร่ายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร (พีเอช 7.0) ให้ได้ความเข้มข้นของสาหร่ายร้อยละ 7 (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปริมาณ 11 มิลลิลิตรในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 45 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปทำลายผนังเซลล์ด้วยเครื่อง Ultrasonic processor รุ่น GE-100 ซึ่งให้คลื่นอัลตราโซนิกที่ความถี่ 20 กิโลเฮิร์ตซ์ โดยใช้ร่วมกับ Stepped microtip ขนาด 1/8 นิ้ว ซึ่งให้ค่าขนาดความสูงของคลื่นสูงสุด 211 ไมโครเมตร ด้วยระยะเวลาการรับคลื่นอัลตราโซนิก หรือ Sonication time (St) นาน 5, 12.5 และ 20 วินาที ที่ขนาดความสูงของคลื่น (Amplitude) ร้อยละ 70 85 และ 100 ในอ่างน้ำแข็ง จากนั้นผสมให้เข้ากัน แล้วดูดตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 2 มิลลิลิตร ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงตะกอนด้วยเครื่อง ALC นาน 30 นาที ที่ 15,826 RCF อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ทันที ก่อนนำส่วนใสไปวัดค่าการดูดกลืนแสงตามวิธีในข้อ 4.3.3

4.3.4.2 การทำลายผนังเซลล์ด้วยวิธี RFT

เตรียมสาหร่ายเช่นเดียวกับหัวข้อ 4.3.4.1 แล้วนำไปทำลายผนังเซลล์ด้วยวิธีการแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส แล้วนำไปละลายที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำกลับไปแช่เยือกแข็งซ้ำอีก โดยทำกระบวนการดังกล่าว 1-3 รอบ และแต่ละรอบแช่เยือกแข็งนาน 1-3 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงตามวิธีในข้อ 4.3.4.1

4.3.4.3 การสกัดต่อเนื่องภายหลังทำลายผนังเซลล์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก

ทำการสกัดต่อเนื่องจากข้อ 4.3.4.1 โดยนำตัวอย่างที่เหลือไปเข้าสู่กระบวนการสกัดด้วยเครื่องเขย่า โดยใช้ความเร็ว 150 รอบต่อนาที ทันที ดังนี้

ชุดที่ 1 สำหรับสายพันธุ์ 1183 โดยสกัดด้วยการเขย่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แล้วเก็บตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ไปวิเคราะห์ประสิทธิภาพการสกัด (Extraction efficiency: EE) เมื่อเขย่าครบ 2.5 และ 8 ชั่วโมง ตามลำดับ

ชุดที่ 2 สำหรับสายพันธุ์ 1183 และ 1213 โดยสกัดด้วยการเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วเก็บตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร ไปวิเคราะห์ประสิทธิภาพการสกัด เมื่อเขย่าครบ 1.2.3 และ 4 ชั่วโมง ตามลำดับ

ทั้งนี้ ประสิทธิภาพการสกัดคำนวณจากปริมาณไฟโคไซยานินที่สกัดได้ คิดเป็นร้อยละเมื่อเทียบกับปริมาณไฟโคไซยานินทั้งหมดที่หาได้จาก 4.3.3

4.3.4.4 การสกัดด้วยไลโซไซม์

เตรียมสารละลายไลโซไซม์ 100 มิลลิกรัม ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร (พีเอช 7.0) 10 มิลลิตร และเตรียมสาหร่ายตามวิธีในหัวข้อ 4.3.4.1 ให้ได้ความเข้มข้นของเอนไซม์ 9.09 และ 18.17 มิลลิกรัมต่อกรัมของสาหร่าย (น้ำหนักแห้ง) จากนั้นนำไปสกัดบนเครื่องเขย่า ด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 44 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเพื่อนำไปวิเคราะห์ประสิทธิภาพการสกัดตามวิธีในหัวข้อ 4.3.4.1 ทุก 1 ชั่วโมง รวม 3 ชั่วโมง

ทุกการทดลองในหัวข้อ 4.3.4 วางแผนการทดลองแบบผลตอบสนองเชิงพื้นผิวชนิด Face-centered cube design (FCD) และทำการสุ่มแบบสมบูรณ์ และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Design-Expert ® รุ่น 7.1 (หมายเลขลิขสิทธิ์ 4015-2935)

4.4 ผลการทดลอง และการอภิปรายผล

4.4.1 ผลของคลื่นอัลตราโซนิกและ RFT ต่อการทำลายผนังเซลล์ของสาหร่าย

จากการติดตามการทำลายผนังเซลล์โดยพิจารณาจากการปลดปล่อยไฟโคไซยานินออกจากเซลล์สู่ตัวทำละลายในรูปของค่าประสิทธิภาพการสกัดในหน่วยร้อยละ พบว่าคลื่นอัลตราโซนิก สามารถทำลายผนังเซลล์ของทั้งสองสายพันธุ์ได้ดีกว่าวิธี RFT และผนังเซลล์สาหร่ายสไปรูลินา 1183 ถูกทำลายด้วยวิธีทั้งสองได้ง่ายกว่าสายพันธุ์ 1213 (ตารางที่ 4.1)

กลไกการทำลายผนังเซลล์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกจะแตกต่างจากวิธี RFT โดยเซลล์สาหร่ายจะได้รับแรงกระทำโดยตรงจากการสั่นสะเทือนด้วยคลื่นอัลตราโซนิกและยังได้รับแรงกระทำจากแรงดันของฟองอากาศที่เกิดขึ้นภายในเซลล์โดยการเหนี่ยวนำของคลื่นอัลตราโซนิกเป็นผลให้ผนังเซลล์ฉีกขาด ซึ่งเกิดขึ้นได้ในเวลาอันสั้น ในขณะที่วิธี RFT จะเกิดจากการฉีกขาดของผนังเซลล์เนื่องจากการขยายตัวและทึบแท่งของฟองน้ำแข็งที่เกิดขึ้นระหว่างการแช่เยือกแข็ง ซึ่งขนาดของรูรั่วและความคงตัวของรูรั่วระหว่างการละลายน้ำแข็งจะมีผลต่ออัตราการแพร่ของ ไฟโคไซยานิน ออกสู่ภายนอกเซลล์ ซึ่งจะเห็นว่าคลื่นอัลตราโซนิก นอกจากจะทำลายผนังเซลล์แล้ว แรงสั่นสะเทือนของคลื่นยังขับให้ไฟโคไซยานินออกสู่สารตัวทำละลายได้ง่าย ต่างจากวิธี RFT ซึ่งอาศัยเพียงการแพร่ผ่านรูรั่วโดยผลของความแตกต่างของความเข้มข้น จึงอาจเป็นผลให้คลื่นอัลตราโซนิกให้ประสิทธิภาพในการสกัดสูงกว่าวิธี RFT

จากผลการศึกษาในบทที่ 3 พบว่าความหนาของผนังเซลล์สายพันธุ์ 1213 มากกว่าความหนาของผนังเซลล์สายพันธุ์ 1183 ประมาณ 1.8 เท่า ความหนาของผนังเซลล์ที่ต่างกันดังกล่าว อาจเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ผนังเซลล์ของสายพันธุ์ 1213 ทนต่อการฉีกขาดได้ดีกว่า

ตารางที่ 4.1 ค่าประสิทธิภาพการสกัดเมื่อทำลายผนังเซลล์ด้วยวิธีการใช้คลื่นอัลตราโซนิกและ RFT

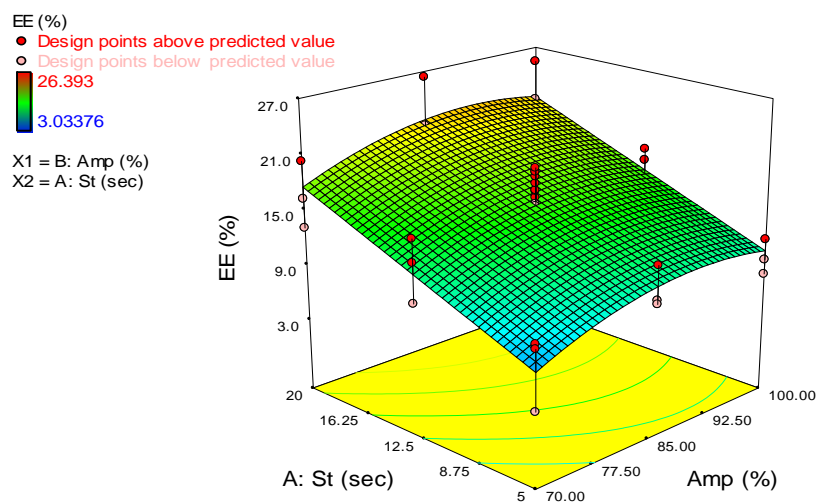
IFRPD	คลื่นอัลตราโซนิก			RFT		
	St (วินาที)	Amp (ร้อยละ)	EE (ร้อยละ)	FTC (รอบ)	Ft (ชั่วโมง)	EE (ร้อยละ)
1183	20	91	22.1	3	3	15.6
1213	20	100	14.2	3	3	3.17

จากการศึกษาพบว่า ระยะเวลาการทำลายผนังเซลล์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก (St) และขนาดความสูงของคลื่น (Amp) มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดและค่า A440 สำหรับทั้งสองสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ ที่ $p < 0.05$ (ภาคผนวก ข รูปที่ 4.1 และรูปที่ 4.3) ค่า A440 จะมีค่าสูงเฉพาะกับสายพันธุ์ 1183 สำหรับวิธี RFT พบว่า ระยะเวลาในการแช่เยือกแข็ง (Ft) และจำนวนรอบในการแช่เยือกแข็ง (FTC) มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดของทั้งสองสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ ที่ $p < 0.05$ (ภาคผนวก ข และรูปที่ 4.2) แต่ค่า A440 สำหรับทั้งสองสายพันธุ์ต่ำกว่าที่ได้จากการใช้คลื่นอัลตราโซนิก

การทำลายผนังเซลล์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกเป็นเวลานาน จะทำให้คลอโรฟิลล์ถูกผสมและทำให้แขวนลอยอยู่ในสารละลายไฟโคไซยานินและปรากฏยอดกราฟที่ค่าความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร (รูปที่ 4.4) เนื่องจากพลังสั่นสะเทือนของคลื่นอัลตราโซนิกซึ่งกระทำโดยตรงต่อสารละลายทำให้เกิดการผสมกันอย่างรุนแรง ผลดังกล่าวจะทำให้การกำจัดคลอโรฟิลล์ออกจากสารละลายไฟโคไซยานินนั้นทำได้ยาก (Furuki และคณะ, 2003)

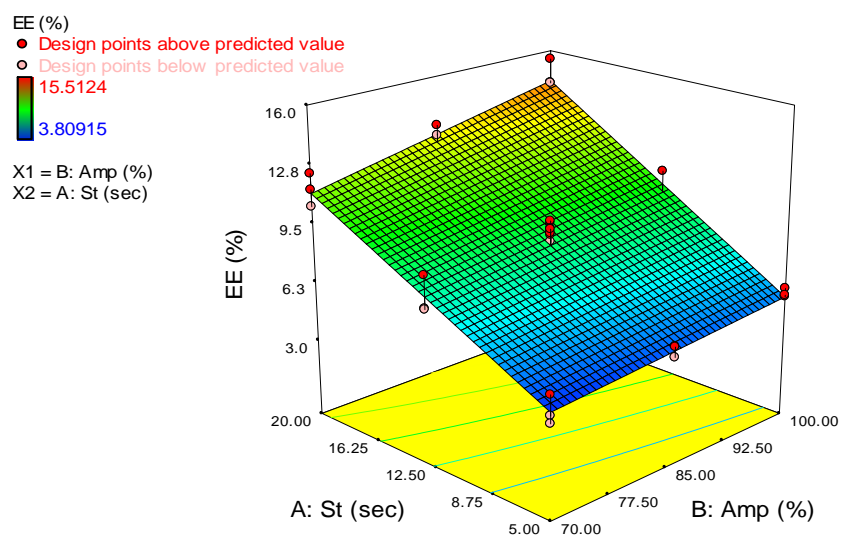
Design-Expert® Software

(ก)



Design-Expert® Software

(ข)



รูปที่ 4.1 ผลตอบสนองเชิงพื้นผิวของคลื่นอัลตราโซนิกต่อการทำลายผนังเซลล์โดยประเมินจากประสิทธิภาพการสกัด (ก) สายพันธุ์ 1183 (ข) สายพันธุ์ 1213

Design-Expert® Software
Transformed Scale

Sqrt(EE (%))

● Design points above predicted value

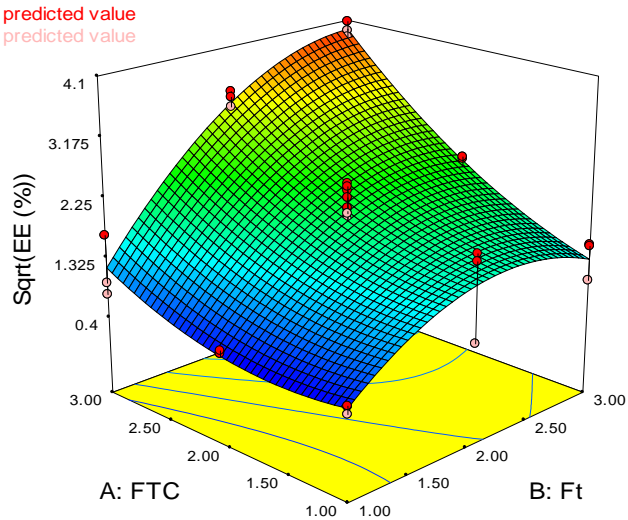
○ Design points below predicted value

4.07981

0.463003

X1 = B: Ft

X2 = A: FTC



(ก)

Design-Expert® Software

EE

● Design points above predicted value

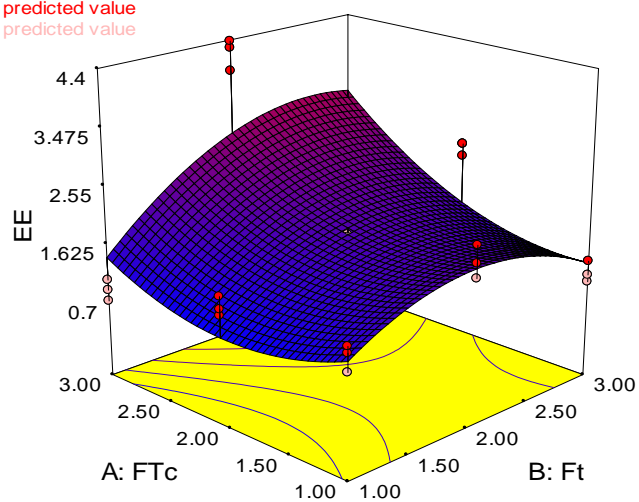
○ Design points below predicted value

4.38

0.71

X1 = B: Ft

X2 = A: FTC



(ข)

รูปที่ 4.2 ผลตอบสนองเชิงพื้นผิวของวิธี RFT ต่อการทำลายผนังเซลล์ โดยประเมินจาก
ประสิทธิภาพการสกัด (ก) สายพันธุ์ 1183 และ (ข) สายพันธุ์ 1213

Design-Expert® Softw are
Transformed Scale
Ln(A440)

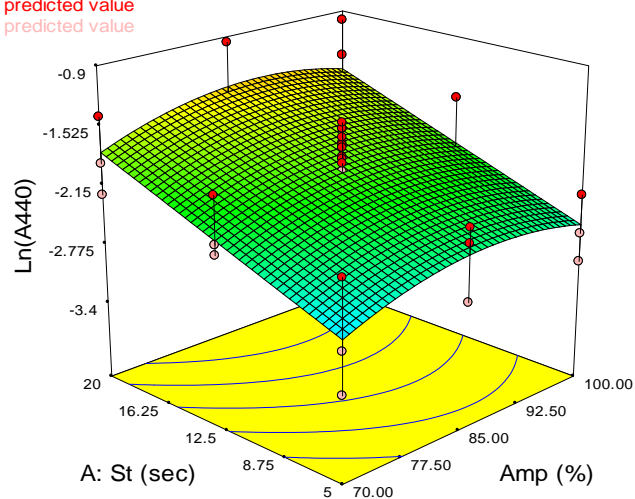
● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value

-0.960449

-3.33673

X1 = B: Amp (%)

X2 = A: St (sec)



(ก)

Design-Expert® Softw are
Transformed Scale
Sqrt(A440)

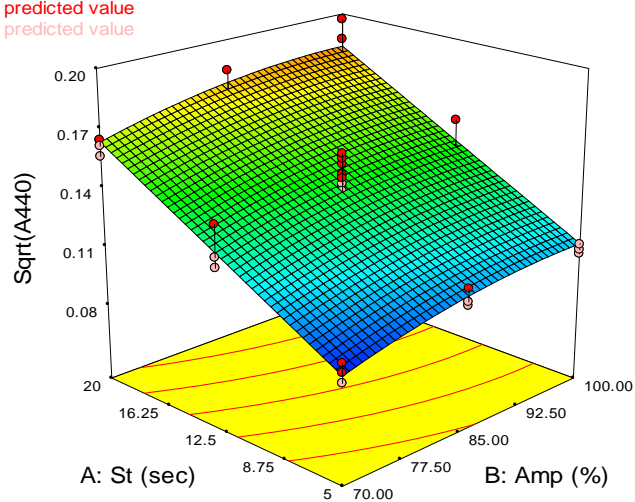
● Design points above predicted value
○ Design points below predicted value

0.197062

0.0898438

X1 = B: Amp (%)

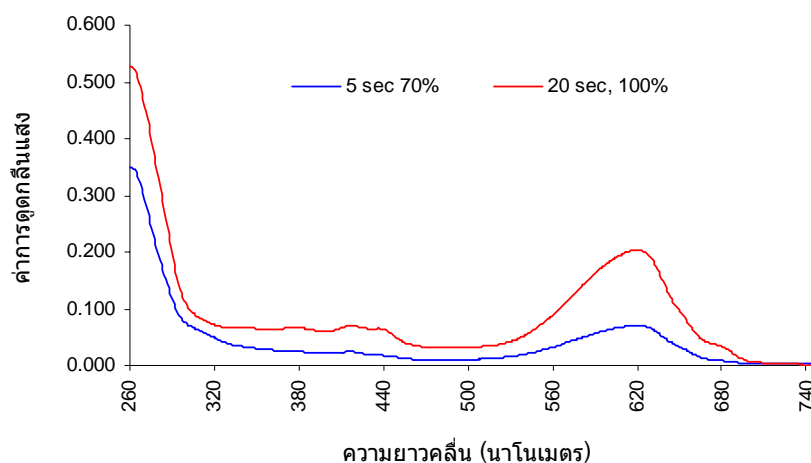
X2 = A: St (sec)



(ข)

รูปที่ 4.3 ผลตอบสนองเชิงพื้นผิวของคลื่นอัลตราโซนิกต่อการปนเปื้อนของคลอโรฟิลล์โดย

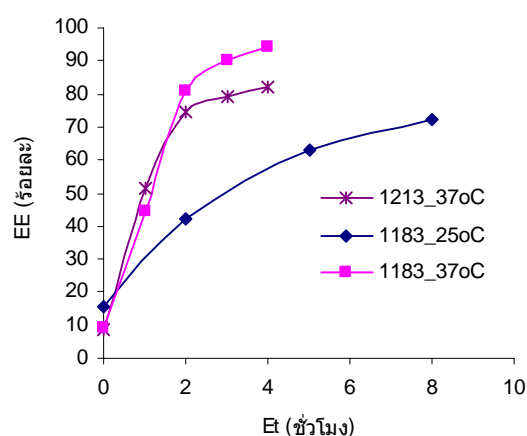
ประเมินจากการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร (ก) สายพันธุ์ 1183 (ข) สายพันธุ์ 1213



รูปที่ 4.4 ค่าการดูดกลืนแสงที่แสดงการเปลี่ยนแปลงของคลอโรฟิลล์ในสารละลาย ไฟโคไซยานินที่ได้จากการทำลายผนังเซลล์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก ที่ค่าความยาวคลื่น 440 นาโนเมตร

หลังขั้นตอนการทำลายผนังเซลล์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกเมื่อนำไปสกัดพบว่า ที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส เวลาสกัด (Et) มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดของสายพันธุ์ 1183 และ 1213 (รูปที่ 4.5) และที่อุณหภูมิเท่ากัน 37 องศาเซลเซียส พบว่า ค่า EE ของการสกัดไฟโคไซยานินจากทั้งสองสายพันธุ์ที่เวลาสกัดต่างๆ กัน ไม่แตกต่างกันทางสถิติ (ภาคผนวก ข) แม้ว่าค่า EE ของ 1183 จะมีแนวโน้มสูงกว่า 1213 ที่เวลาสกัด 3-4 ชั่วโมง

สำหรับสายพันธุ์ 1183 พบว่า การสกัดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะให้ค่า EE สูงกว่าการสกัดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ที่เวลาสกัดเท่ากัน



รูปที่ 4.5 ค่า EE ของการสกัดไฟโคไซยานินจากสายพันธุ์ 1183 และ 1213 โดยผลของระยะเวลาสกัด

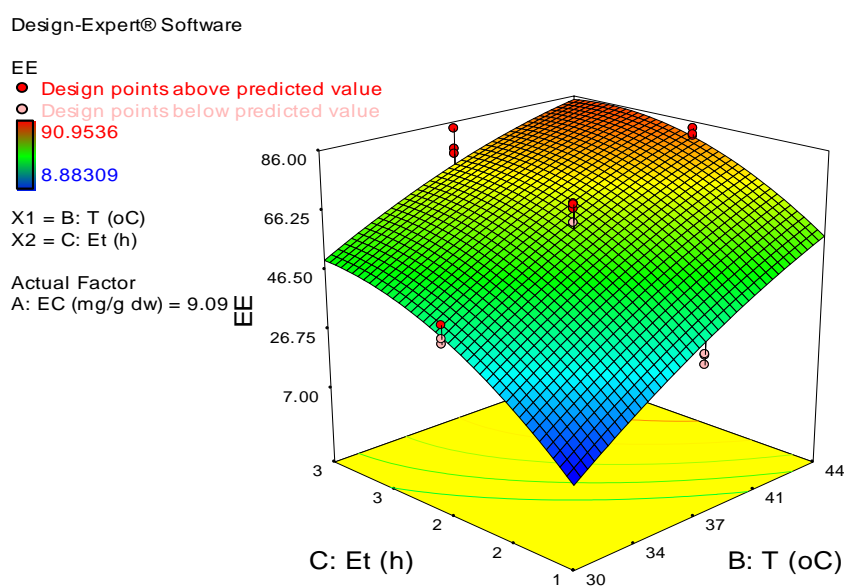
4.4.2 ผลจากการสกัดด้วยไลโซไซม์

จากการทดลองพบว่า ค่า Et และอุณหภูมิในการสกัดมีผลต่อค่า EE และ A440 ของทั้งสองสายพันธุ์อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) แม้ว่าปริมาณไลโซไซม์ (EC) จะไม่มีผลต่อค่า EE ของสายพันธุ์ 1183 แต่มีผลต่อค่า EE ของสายพันธุ์ 1213 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ผลดังกล่าวนี้อาจเป็นผลจากพื้นที่ผิวของไตรโคมาที่แตกต่างกัน ซึ่งจากผลการทดลองในบทที่ 3 พบว่า สายพันธุ์ 1213 มีพื้นที่ผิวสูงกว่า 1183 เป็น 1.5 เท่า ที่ความยาวระยะขจัดของไตรโคมาเท่ากัน ดังนั้นโอกาสที่ไลโซไซม์จะเข้าถึงผนังเซลล์ของสายพันธุ์ 1213 จึงมากกว่า 1183

ตัวแปรในรูปที่ 4.6 และ 4.7 มีความสัมพันธ์กันตามสมการที่ 1 และ 2 ตามลำดับ จากสมการดังกล่าว สามารถสรุปเปรียบเทียบประสิทธิภาพการสกัดได้ดังในตารางที่ 4.2 ซึ่งพบว่า ตัวอย่างที่ใช้เอนไซม์ให้ค่า EE สูงกว่าเมื่อสกัดด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เพียงอย่างเดียวเพียงร้อยละ 5.7 และ 6.4 สำหรับสายพันธุ์ 1183 และ 1213 ตามลำดับ

$$\begin{aligned} EE (\%) = & -260.8 - (2.0 \times EC) + (9.9 \times T) + (76.0 \times Et) + (0.04 \times EC \times T) \\ & - (0.58 \times T \times Et) + (0.04 \times EC^2) - (0.08 \times T^2) - (9.4 \times Et^2) \end{aligned} \quad \dots(1)$$

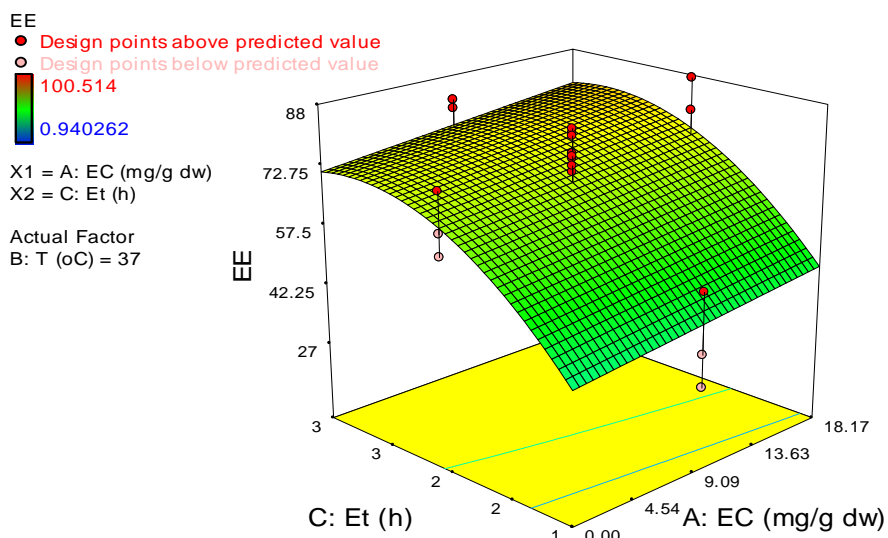
$$\begin{aligned} EE (\%) = & -298.8 + (0.4 \times EC) + (7.8 \times T) + (129.5 \times Et) \\ & - (1.9 \times T \times Et) - (11.3 \times Et^2) \end{aligned} \quad \dots(2)$$



รูปที่ 4.6 ผลตอบสนองเชิงพื้นที่ผิวของค่า EE ของไฟโคไซยานินจากสายพันธุ์ 1183 โดยผลของอุณหภูมิและค่า Et

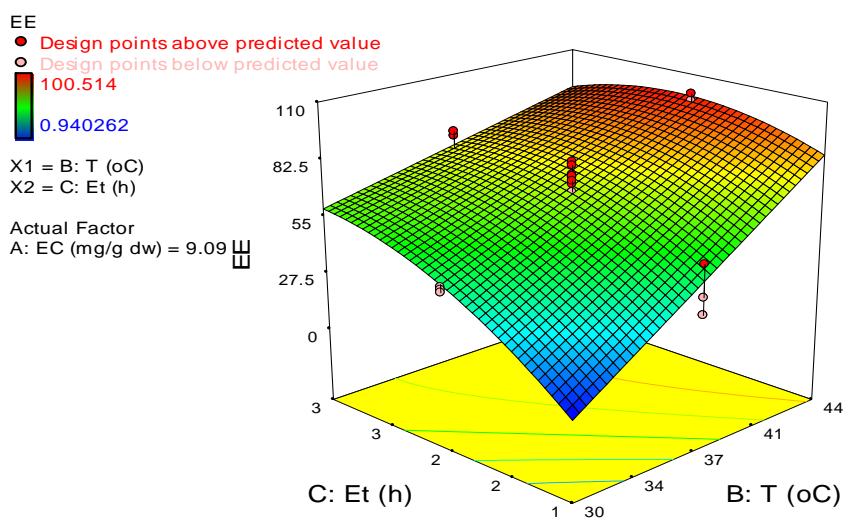
Design-Expert® Software

(ก)



Design-Expert® Software

(ข)



รูปที่ 4.7 ผลตอบสนองเชิงพื้นผิวของค่า EE ของไฟโคไซยานินจากสาขพันธุ์ 1213 (ก) โดยผลของอุณหภูมิและความเข้มข้นของเอนไซม์ที่ใช้สกัด (ข) โดยผลของอุณหภูมิและระยะเวลาสกัด

ตารางที่ 4.2 ประสิทธิภาพการสกัดไฟโคไซยานินด้วยไลโซไซม์

สายพันธุ์	ความเข้มข้นของไลโซไซม์ (มิลลิกรัม/กรัมของน้ำหนักแห้ง)	อุณหภูมิที่สกัด (°C)	ระยะเวลาสกัด (ชั่วโมง)	EE (ร้อยละ)
1183	0	44	3	86.0
	18.17	44	3	91.7
1213	0	44	2	95.8
	16.12	44	2	102.2

จากการทดลองเปรียบเทียบการสกัดไฟโคไซยานินด้วยน้ำ RO (Reverse osmosis water) และสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร พีเอช 7.0 โดยไม่เติม เอนไซม์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเขย่าด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที พบว่าที่เวลาสกัด 1 ชั่วโมงเท่ากัน ตัวอย่างที่สกัดด้วยสารละลายบัฟเฟอร์จะมีประสิทธิภาพการสกัดสูงกว่าถึง 76.7 เท่า (ตารางที่ 4.3) ผลดังกล่าวบ่งชี้ว่าความเข้มข้นของอนุโมลในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์มีบทบาทสำคัญในการทำลายผนังเซลล์ของสาหร่ายสีโปรตีน ซึ่ง Viskari และ Colyer (2003) อธิบายว่า สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เจือจางจะทำให้เซลล์สาหร่ายแตกและแตกโดยผลของ Osmotic shock

ตารางที่ 4.3 ประสิทธิภาพในการสกัดไฟโคไซยานินจากสายพันธุ์ 1213 ที่อุณหภูมิ 37

องศาเซลเซียส เมื่อใช้น้ำอาร์โอ สารละลายบัฟเฟอร์และไลโซไซม์เป็นตัวสกัด

ระยะเวลาสกัด (ชั่วโมง)	ประสิทธิภาพการสกัด (ร้อยละ)		
	น้ำอาร์โอ	บัฟเฟอร์ ⁽¹⁾	บัฟเฟอร์และไลโซไซม์ ⁽²⁾
1	0.6	46.0	53.65
2	2.4	67.0	78.45
3	4.4	69.5	81.51
4	5.5	71.9	82.44

⁽¹⁾ สารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร พีเอช 7.0

⁽²⁾ ไลโซไซม์ 18.1 มิลลิกรัมในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 มิลลิลิตร

4.5 สรุปผลการวิจัย

ในขั้นตอนการทำลายผนังเซลล์ สรุปได้ว่า การใช้คลื่นอัลตราโซนิกจะสามารถทำลายผนังเซลล์ได้ดีกว่าการใช้วิธี RFT สำหรับทั้งสองสายพันธุ์ โดยที่คลื่นอัลตราโซนิกและวิธี RFT สามารถทำลายผนังเซลล์ของสายพันธุ์ 1183 ได้ดีกว่า 1213

อุณหภูมิและระยะเวลาสัปดาห์มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดไฟโคไซยานินของทั้งสองสายพันธุ์ เมื่อนำไปสกัดต่อด้วยการเขย่าหลังจากการทำลายผนังเซลล์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก โดยที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะสกัดได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แต่ระหว่างสองสายพันธุ์จะให้ผลการสกัดไม่แตกต่างกันที่อุณหภูมิเท่ากัน

อุณหภูมิและระยะเวลาสัปดาห์มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดไฟโคไซยานินของสองสายพันธุ์ เมื่อสกัดโดยใช้ไลโซไซม์ร่วมกับการเขย่าอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้ ที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียสจะให้ประสิทธิภาพการสกัดสูงที่สุด และที่อุณหภูมิดังกล่าว สายพันธุ์ 1213 จะถูกสกัดได้ดีกว่า สายพันธุ์ 1183

แต่อย่างไรก็ตาม แม้ว่าปริมาณเอนไซม์จะมีผลต่อการสกัดของสายพันธุ์ 1213 แต่ปริมาณที่สกัดได้เมื่อเทียบกับไม่ใช้เอนไซม์มีความแตกต่างกันเพียงร้อยละ 6.4 สำหรับสายพันธุ์ 1213 และผลจากการเปรียบเทียบการสกัดด้วยบัฟเฟอร์และน้ำอาร์โอ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่า ความเข้มข้นของอนุโมลในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์มีบทบาทสำคัญในการทำลายผนังเซลล์ของสาหร่ายสไปรูลินา

4.6 รายการอ้างอิง

- Ciferri, O. (1983). *Spirulina*, the edible microorganism. **Microbiol. Rev.** 47: 551-578.
- Hatti-Kaul, R. and Mattiasson, B. (2003). **Release of Protein from Biological Host.** In R. Hatti-Kaul and Mattiasson (eds). **Isolation and Purification of Proteins** (pp: 1-27). USA: Marcel Dekker.
- Furuki, T., Maeda, S., Imajo, S., Hiroi, T., Amaya, T., Hirokawa, T., Ito, K. and Nozawa, H. (2003). Rapid and selective extraction of phycocyanin from *Spirulina platensis* with ultrasonic cell disruption. **J. Applied Phycology.** 15(4): 319 – 324.
- Patel, A., Mishra, S., Pawar, R. and Ghosh, P.K. (2005). Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. **Protein Expression and Purification.** 40: 248–255.

- Rezwan, M., Lanéelle, M.A., Sander, P. and Daffé, M. (2007) Breaking down the wall: Fractionation of mycobacteria. **J. Microbiological Methods**. 68: 32-39.
- Van Eykelenburg, C. (1977). On the morphology and ultrastructure of the cell wall of *Spirulina platensis*. **Antonie van Leeuwenhoek**. 43: 89-99.
- Van Eykelenburg, C. (1978). A glucan from the cell wall of the cyanobacterium *Spirulina platensis*. **Antonie van Leeuwenhoek**. 44: 321-327.
- Viskari, P.J. and Colyer, C.L. (2003). Rapid extraction of phycobiliproteins from cultured cyanobacteria samples. **Analytical Biochemistry**. 319: 263–271.
- Yi, P., Zhao, Y.-J. and Guo, H.-L.(2005). Induction of vacuolated spheroplasts and isolation of vacuoles in cyanobacteria. **J. Phycology**. 41 (2):366-369.
- Zarrouk, C. (1966). **Contribution Aletude dune Cyanophycea: Influnce de Divers Facteurs Physiques et Chimiques sur la Croissance et la Photosynthese de *Spirulina maxima***. PhD. Thesis, Paris.

บทที่ 5

ผลของพีเอชและความร้อนที่มีต่อความคงตัวของไฟโคไซยานินในสารละลาย

5.1 บทคัดย่อ

การศึกษาผลของพีเอชและความร้อนที่มีต่อความคงตัวของไฟโคไซยานินทำในสารละลายซีเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่มีไฟโคไซยานินเข้มข้น 123 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยบัฟเฟอร์มีค่าความเข้มข้นของประจุ (Ionic strength) 0.1 โมลต่อลิตร และปรับพีเอช เป็น 3.0 4.0 4.5 5.0 และ 6.0 พบว่าที่พีเอชต่างๆ ไฟโคไซยานินจะยังคงสภาพทางธรรมชาติได้ที่พีเอชสูงกว่าหรือเท่ากับ 5.0 ส่วนผลการให้ความร้อนอย่างต่อเนื่องจาก 30 องศาเซลเซียส ถึง 68 องศาเซลเซียส ในเวลา 240 วินาที พบว่าสารละลายไฟโคไซยานินที่พีเอช 5.0 มีความคงตัวต่อความร้อนมากที่สุด

5.2 บทนำ

ไฟโคไซยานินเป็นไบลิโปรตีนหรือโปรตีนที่มีสีฟ้า พบเป็นองค์ประกอบหนึ่งในไฟโคไลโซมของสาหร่ายสีโปรโตไลนา มีหน้าที่ในการเก็บเกี่ยวพลังงานจากแสงแดดเพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง สารที่ให้สีแก่ไฟโคไซยานินมีชื่อเรียกว่าไฟโคไซยานโนไบลินซึ่งเป็นหมู่พอสทีติกที่เกาะอยู่บนอะโปโปรตีน อันเป็นโครงสร้างหลักของไฟโคไซยานิน ไฟโคไซยานโนไบลินมีโครงสร้างโมเลกุลเป็นเตตราไพร์รอลโซ่เปิด (Open-chain tetrapyrrole) ต่อกับอะโปโปรตีนด้วยพันธะไทโออีเทอร์

โครงสร้างโมเลกุลของไฟโคไซยานิน จะประกอบด้วยหน่วยย่อยที่มีโครงสร้างแบบเกลียวอัลฟา 2 หน่วย คือ หน่วยย่อยอัลฟา และหน่วยย่อยเบต้ารวมตัวเป็นเฮทเทอโรไดเมอร์ แต่โดยทั่วไปนิยมเรียกว่า อัลฟาบิต้าโมโนเมอร์ ซึ่งที่ค่าพีเอชเป็นกลางมักรวมตัวเป็นไตรเมอร์ (MacColl, 1998) แต่ในสภาพธรรมชาติไฟโคไซยานินจะรวมตัวเป็นเฮกซะเมอร์ (Berns และ MacColl, 1989) แต่อย่างไรก็ตาม การรวมตัวและแยกตัวของโมโนเมอร์เป็นไดเมอร์ ไตรเมอร์ เฮกซะเมอร์ หรือโมเลกุลที่ใหญ่กว่า จะขึ้นกับปัจจัยหลักสองปัจจัยคือ ค่าพีเอชและความเข้มข้นของไฟโคไซยานิน (Kao, Edwards และ Berns, 1975) ไฟโคไซยานโนไบลิน จะให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 2 ช่วงความยาวคลื่นคือประมาณ 360-370 และ 615-620 นาโนเมตร แต่เมื่อไฟโคไซยานินสูญเสียสภาพทางธรรมชาติจะทำให้ค่าสัดส่วนการดูดกลืนแสง ระหว่าง 615 ต่อ 360 นาโนเมตร (A615/A360) ลดลง ซึ่งเป็นผลจากการจัดเรียงโมเลกุลของโปรตีนเปลี่ยนแปลงไป และการจัดเรียงโมเลกุลของไฟโคไซ-

ยาโนไบลินจะเปลี่ยนตามด้วย (Berns และ MacColl, 1989) ไฟโคไซยานินจะสูญเสียสภาพทางธรรมชาติที่อุณหภูมิ 65.2 องศาเซลเซียส ในขณะที่โปรตีนชนิดอื่นๆ ที่ปนอยู่ในสารละลายไฟโคไซยานินจะสูญเสียสภาพทางธรรมชาติที่อุณหภูมิต่ำกว่า 65 องศาเซลเซียส (Topchishvili และคณะ, 2002) ซึ่งในงานวิจัยนี้ต้องการศึกษาความคงตัวของไฟโคไซยานินในสารละลาย ที่พีเอช 3.0–6.0 และอุณหภูมิ 30–68 องศาเซลเซียส

5.3 วิธีดำเนินการวิจัย

5.3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

ใช้สารห่วยจากข้อ 4.3.2 ในบทที่ 4

สารไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต โมโนโซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และกรดซิตริก ชนิดที่ใช้สำหรับงานวิเคราะห์ (ACS-for analysis grade) ผลิตโดยบริษัท Carlo Erba Reagenti ประเทศอิตาลี

5.3.2 วิธีเตรียมตัวอย่างสารละลายไฟโคไซยานิน

เตรียมตัวอย่างสารห่วยในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร (พีเอช 7.0) ให้ได้ความเข้มข้นของสารห่วยร้อยละ 7 (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วนำไปทำให้เซลล์แตกด้วยวิธีการแช่เยือกแข็งสลับกับการละลายน้ำแข็ง 2 รอบ โดยแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รอบละ 3 ชั่วโมง และละลายน้ำแข็งที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง จากนั้นนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 12 ชั่วโมง แล้วนำไปแยกส่วนของเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง Hettich Zentrifugen รุ่น Universal 16R เป็นเวลา 30 นาที ที่ 15 องศาเซลเซียส ด้วยแรงเหวี่ยง 13,000 RCF

นำของเหลวใสสีฟ้าที่ได้มาเจือจางด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้สกัด ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่า 1.0 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Biochrom รุ่น Libra S22 UV/VIS spectrophotometer โดยกราดความยาวคลื่นด้วยโปรแกรม Acquire Wavescan รุ่น 1.01 ในช่วง 250 ถึง 750 นาโนเมตร โดยใช้ Cuvette แบบควอตซ์ (quartz cell) ขนาดกว้าง 1 เซนติเมตร แล้วคำนวณปริมาณไฟโคไซยานินในสารละลายที่สกัดได้ จากสมการ (Patel และคณะ, 2005) ดังนี้

$$\text{ปริมาณไฟโคไซยานิน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)} = [A_{620} - 0.474 A_{652}] / 5.34$$

จากนั้นปรับความเข้มข้นของไฟโคไซยานินให้ได้ 12.42 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บที่ 4 องศาเซลเซียส ระหว่างรอนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

5.3.3 การศึกษาผลของค่าพีเอชต่อการจัดเรียงโมเลกุลของไฟโคไซยานินในสารละลาย

เตรียมสารละลายตัวอย่างโดยเจือจางสารละลายไฟโคไซยานินจากข้อ 5.3.2 ปริมาณ 20 ไมโครลิตร ด้วยสารละลายโซเดียมซิเตรทฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Sodium citrate-phosphate buffer) ความเข้มข้นของไอออน 0.1 โมลต่อลิตร ให้ได้สารละลายไฟโคไซยานินเข้มข้น 123 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่พีเอช 5 ระดับ คือ 3.0 4.0 4.5 5.0 และ 6.0 ปริมาณ 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่อง Biochrom รุ่น Libra S22 UV/VIS Spectrophotometer โดยการกวาดค่าความยาวคลื่นด้วยโปรแกรม Acquire Wavescan รุ่น 1.01 ระหว่าง 250 – 750 นาโนเมตร โดยใช้ Cuvette แบบควอตซ์ ขนาดกว้าง 1 เซนติเมตร วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงการจัดเรียงโมเลกุลของไฟโคไซยานินโดยใช้อัตราส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร และ 370 นาโนเมตร (Kupka และ Scheer, 2007)

นำตัวอย่างที่เตรียมได้ ไปวิเคราะห์การคลายตัวของโปรตีนในไฟโคไซยานินด้วยเครื่องสเปกโตรฟลูออโรมิเตอร์ (Spectrofluorometer) Shimadzu รุ่น RF-1501 โดยวัดที่ $\lambda_{ex} = 590$ นาโนเมตร (Kupka และ Scheer, 2007)

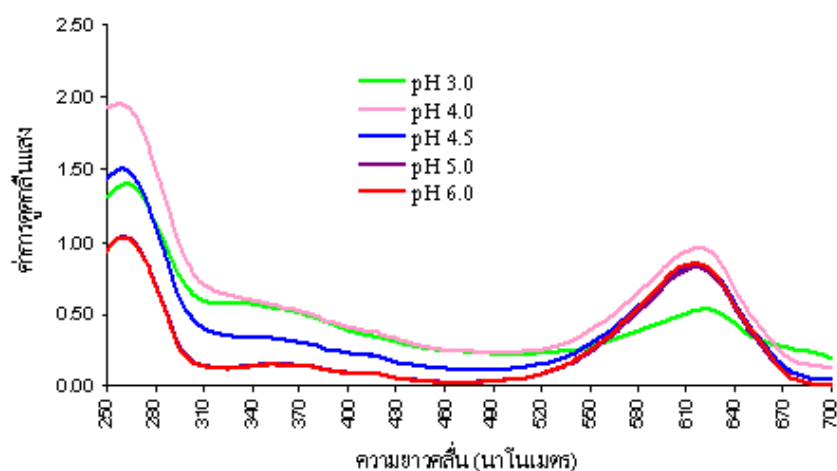
5.3.4 การศึกษาผลของความร้อนและพีเอชต่อการจัดเรียงโมเลกุลของไฟโคไซยานิน

เตรียมสารละลายตัวอย่างเช่นเดียวกับในข้อ 5.3.3 ใน Cuvette แบบควอตซ์ ขนาดกว้าง 1 เซนติเมตร แล้วนำไปอุ่นในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 32 องศาเซลเซียสให้ได้อุณหภูมิของตัวอย่างเริ่มต้นเท่ากับ 30 องศาเซลเซียส แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Biochrom Libra S22 UV/VIS spectrophotometer ที่มีชุดให้ความร้อนแก่ Cuvette ที่อุณหภูมิ 71.5 องศาเซลเซียส นาน 240 วินาที โดยบันทึกค่าการดูดกลืนแสงที่ 370 และ 620 นาโนเมตร ทุกๆ 10 วินาที และบันทึกค่าอุณหภูมิของสารละลายไฟโคไซยานินที่เพิ่มสูงขึ้นทุกๆ 10 วินาทีด้วยเครื่องบันทึกอุณหภูมิ Fluke 54II

5.4 ผลการทดลอง และการอภิปรายผล

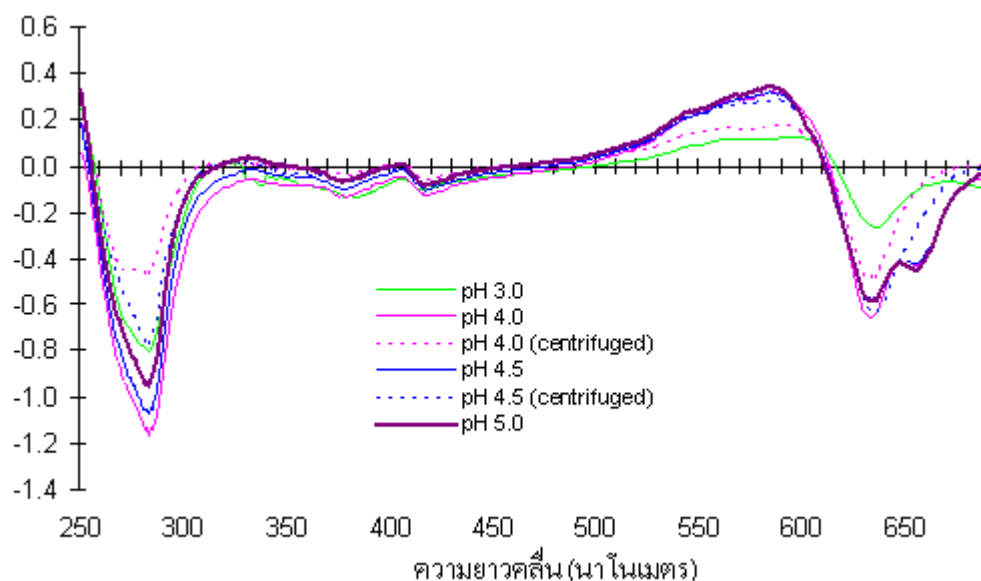
5.4.1 ผลของพีเอช

ค่าการดูดกลืนแสงของไฟโคไซยานินที่ค่าพีเอชต่างๆ แสดงในรูปที่ 5.1 ซึ่งพบว่าที่พีเอช 5.0 และ 6.0 เส้นกราฟจะใกล้เคียงกันมาก ที่พีเอชต่ำกว่าหรือเท่ากับ 4.5 สารละลายไฟโคไซยานินจะมีลักษณะปั่น ค่าการดูดกลืนแสงที่ 370 นาโนเมตรจะเพิ่มขึ้นเมื่อค่าพีเอชลดลงต่ำกว่า 5.0 ในขณะที่การดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตรจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อยเมื่อลดพีเอชจาก 5.0 เป็น 4.0 แต่ค่าดังกล่าวจะลดลงมากที่พีเอช 3.0 และพบว่าค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดจะเปลี่ยนแปลงในทิศทางช่วงคลื่นสีแดง (Red shift) จาก 615 นาโนเมตรเป็น 622 นาโนเมตรเมื่อพีเอชลดลงจาก 6.0 เป็น 3.0



รูปที่ 5.1 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายไฟโคไซยานินที่พีเอช 3.0 – 6.0 อุณหภูมิ 28 ± 2 องศาเซลเซียส

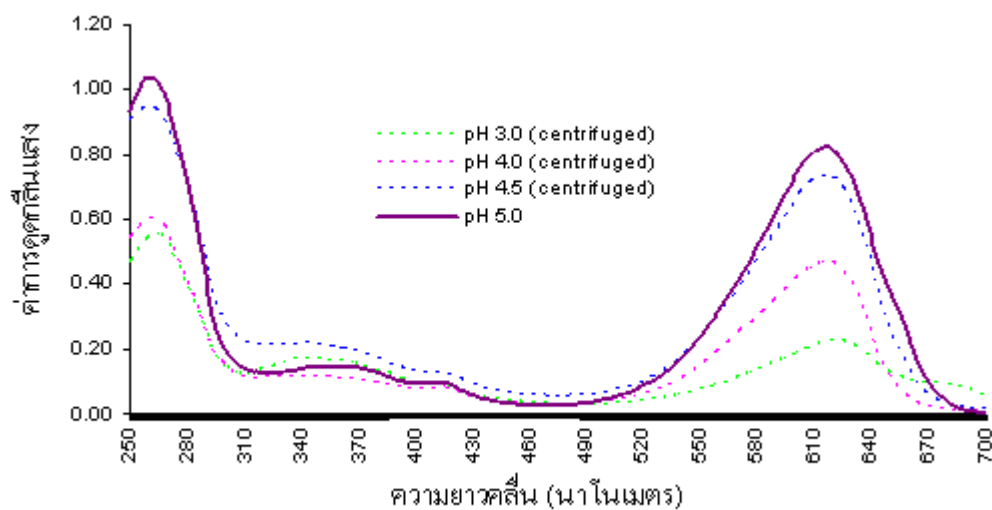
เมื่อนำข้อมูลค่าการดูดกลืนแสงดังกล่าวมาสร้างเป็นกราฟอนุพันธ์ระดับที่ 1 (ดูรายละเอียดวิธีการสร้างกราฟในภาคผนวก) เพื่อดูอัตราการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงต่อหน่วยของ ค่าความยาวคลื่น พบว่าไฟโคไซยานินที่พีเอช 3.0 ปรากฏยอดกราฟเพียงยอดเดียวในช่วงความยาวคลื่น 600-700 นาโนเมตร ในขณะที่ที่พีเอช 4.0-6.0 จะปรากฏยอดกราฟ 2 ยอดในช่วงความยาวคลื่นเดียวกัน แต่เมื่อนำตัวอย่างที่พีเอช 4.0 และ 4.5 ไปปั่นเหวี่ยง แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสง พบว่าในช่วงความยาวคลื่น 600-700 นาโนเมตรปรากฏยอดกราฟเพียงยอดเดียว (รูปที่ 5.2) แม้ว่าค่าอัตราส่วน A620/A370 หลังการปั่นเหวี่ยง เมื่อคำนวณจากค่าในรูปที่ 5.3 จะสูงขึ้นก็ตาม ผลดังกล่าวนี้บ่งชี้ว่าไฟโคไซยานินที่ยังละลายอยู่หลังการปั่นเหวี่ยงที่พีเอชต่ำกว่า 5.0 จะเกิดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติคล้ายกับที่พีเอช 3.0



รูปที่ 5.2 อนุพันธ์ระดับที่ 1 ของค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายไฟโคไซยานิน:

เปรียบเทียบระหว่างก่อนและหลังปั่นเหวี่ยงที่พีเอช 4.0 และ 4.5 กับ

ตัวอย่างที่พีเอช 3.0 และ 5.0 ซึ่งไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยง



รูปที่ 5.3 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายไฟโคไซยานิน : เปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างที่พีเอช

3.0 4.0 และ 4.5 หลังการปั่นเหวี่ยง กับตัวอย่างที่พีเอช 5.0 ซึ่งไม่ผ่านการปั่นเหวี่ยง

ข้อมูลจากตารางที่ 5.1 ยังชี้ให้เห็นว่า ที่พีเอช 4.5 และต่ำกว่า ไฟโคไซยานินจะเกิดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติ และการสูญเสียดังกล่าวจะสูงขึ้นเมื่อพีเอชต่ำลง

ตารางที่ 5.1 การเปลี่ยนแปลงของปริมาณไฟโคไซยานินในสารละลายโดยผลของพีเอช

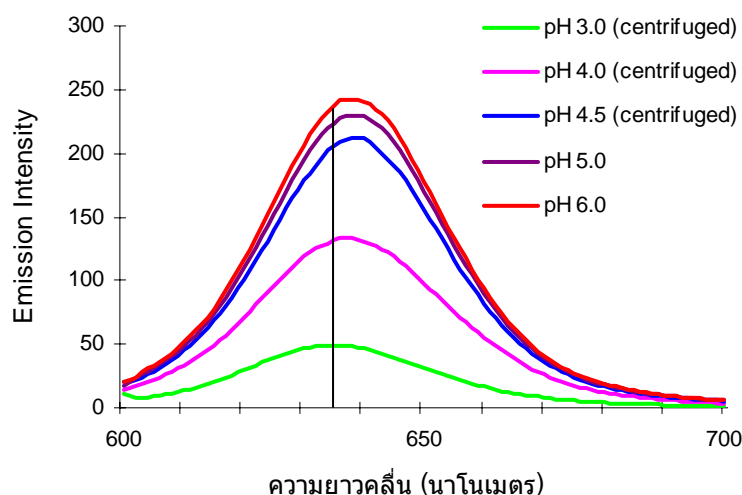
พีเอช	ปริมาณไฟโคไซยานิน (มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)	ค่าร้อยละของการสูญเสีย ⁽¹⁾
6.0	11.62	
4.5 (หลังปั่นเหวี่ยง)	10.06	13.43
4.0 (หลังปั่นเหวี่ยง)	6.42	44.75
3.0 (หลังปั่นเหวี่ยง)	3.16	72.81

⁽¹⁾ ปริมาณไฟโคไซยานินที่สูญเสียไปคิดเป็นร้อยละเมื่อเทียบกับปริมาณไฟโคไซยานินที่พีเอช 6.0

Kao, Edwards และ Berns (1975) อธิบายว่าในสภาพปกติ โครงสร้างของไฟโคไซยานินจะถูกทำให้เสถียรด้วยอันตรกิริยาไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic interaction) และอันตรกิริยาไฟฟ้าสถิต เมื่อค่าพีเอชเข้าใกล้ค่าพีไอ (Isoelectric point: pI) ของไฟโคไซยานิน (4.69) ค่าประจุสุทธิของระบบจะลดลงจนเข้าใกล้ศูนย์ ปรากฏการณ์ดังกล่าวจะเหนี่ยวนำให้ไฟโคไซยานินรวมถึงโปรตีนอื่นๆ ในสารละลายรวมตัวกันเป็นกลุ่ม ซึ่งอาจเป็นผลให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตรสูงขึ้นเล็กน้อยที่พีเอช 4.0–4.5 ซึ่งบ่งชี้ว่าไฟโคไซยานินที่พีเอชต่ำกว่า 5.0 เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพทางธรรมชาติไปแล้ว

Schirmer, Bode และ Huber (1987) อธิบายปัจจัยที่มีผลต่อความเสถียรของไฟโคไซยานินว่า ร้อยละ 50 ของโซ่ข้างที่มีประจุ (Charged side-chain) บนโมเลกุลของหน่วยย่อยอัลฟาและเบต้า รวมถึงโพรพิโอนิกที่อยู่ด้านข้าง (Propionic side-chain) ของไฟโคไซยานโนไบลินเกี่ยวข้องกับเกิดอันตรกิริยาประจุบวกและลบ (Salt bridge) ทั้งภายในหน่วยย่อยเดียวกันและระหว่างหน่วยย่อยที่อยู่ใกล้กัน เฉพาะอย่างยิ่ง Aspartate-Arginine salt bridge ซึ่งพบว่าเป็นการเกิดอันตรกิริยาประจุบวกและลบระหว่างหน่วยย่อยที่สำคัญที่มีผลต่อความเสถียรของโครงสร้างของไฟโคไซยานิน ดังนั้น ที่พีเอชต่ำกว่าค่าพีเคเอ (pK_a) ของกรดแอสพาทิก (3.9) และกรด โพรพิโอนิก (4.9) อันตรกิริยาประจุบวกและลบทั้งสองจะถูกทำลายและเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการจัดเรียงโมเลกุลของไฟโคไซยานินและไฟโคไซยานโนไบลิน เมื่อไฟโคไซยานินเกิดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติโดยผลของพีเอช ซึ่ง Berns และ MacColl (1989) สรุปว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงที่ 370 นาโนเมตร และการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร ดังนั้นจากรูปที่ 5.1 ซึ่งคำนวณค่าอัตราส่วน A620/A370 ที่พีเอช 3.0 4.0 4.5 5.0 และ 6.0 ได้ 1.0 1.9 2.8 5.8 และ 6.0 ตามลำดับ จึงกล่าวได้ว่าไฟโคไซยานินเกิดการคลายตัวและสูญเสียสภาพทางธรรมชาติมากขึ้นเมื่อพีเอชลดลง และสามารถยืนยันคำอธิบายดังกล่าวได้ด้วยรูปที่ 5.4 ซึ่ง

ค่าความเข้มของการเรืองแสงของไฟโคไซยานินมีค่าต่ำลงเมื่อพีเอชต่ำลง และที่พีเอชต่ำกว่า 4.5 ค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดจะเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางช่วงคลื่นสีฟ้า (Blue shift) และมีความสามารถในการเรืองแสงลดต่ำลง บ่งชี้ว่าในช่วงพีเอชดังกล่าวโปรตีนในไฟโคไซยานินเกิดการคลายตัวหรือสูญเสียสภาพทางธรรมชาติ เป็นผลให้การจัดเรียงตัวของไฟโคไซยานโนไบลินเปลี่ยนแปลงไป



รูปที่ 5.4 ค่าความเข้มการเรืองแสงของสารละลายไฟโคไซยานินที่ $\lambda_{ex} = 590$ นาโนเมตร ที่พีเอชต่างๆ กัน

Schirmer, Bode และ Huber (1987) อธิบายความสัมพันธ์ระหว่างการจัดเรียงโมเลกุลของไฟโคไซยานโนไบลินและไฟโคไซยานิน โดยกล่าวถึงการเกิดอันตรกิริยาประจุบวกและลบระหว่างโซ่ข้างโพธิ์ไอออนิกบนโมเลกุลของไฟโคไซยานโนไบลินกับอาร์จินีน หรือไลซีน บนโมเลกุลของหน่วยย่อย และการเกิดพันธะไฮโดรเจนระหว่างกรดแอสพาทิกบนโมเลกุลของหน่วยย่อย (Aspartate amino acid residue) กับไนโตรเจนบนโมเลกุลของไฟโคไซยานโนไบลิน ซึ่งจะทำให้โมเลกุลของไฟโคไซยานโนไบลินถูกตรึงให้อยู่ในลักษณะคลีโมเลกุลเป็นแนวตรง (Extended conformational state) ซึ่งในสภาพดังกล่าว ไฟโคไซยานโนไบลินจะดูดกลืนแสงที่ค่าความยาวคลื่น 620 นาโนเมตรได้สูงกว่าเมื่ออยู่ในรูปม้วนเป็นวง (Cyclic conformational state) (Scheer และ Kufer, 1977) ดังนั้นเมื่ออันตรกิริยาประจุบวกและลบและ/หรือ พันธะไฮโดรเจนดังกล่าวถูกทำลายลง จะโดยผลของการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช หรือความร้อน หรือการคลายตัวของโมเลกุลของหน่วยย่อย ย่อมทำให้ไฟโคไซยานินดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตรได้น้อยลง ดังนั้นเมื่อนำความสัมพันธ์ระหว่างการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ 370 นาโนเมตร เมื่อโปรตีนเสียสภาพทางธรรมชาติ และการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตรเมื่อรูปแบบการจัดเรียงโมเลกุลของไฟโค-

ไซยานินไบลินเปลี่ยนไปดังกล่าวข้างต้นมาอธิบาย จะพบความสัมพันธ์ของอัตราส่วน A620/A370 กับการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติของไฟโคไซยานิน ซึ่งจากรายงานของ Scheer และ Kufer (1977) และ Kupka และ Scheer (2007) พบว่าอัตราส่วน A620/A370 จะมีค่าประมาณ 0.4-0.5 เมื่อไฟโคไซยานินสูญเสียสภาพทางธรรมชาติโดยสมบูรณ์

แม้ว่าที่พีเอช 3.0 ไฟโคไซยานินจะไม่สูญเสียสภาพทางธรรมชาติโดยสมบูรณ์เมื่อพิจารณาจากอัตราส่วนดังกล่าว แต่โปรตีนซึ่งมีความเข้มข้นต่ำเช่นที่ใช้ในการทดลองนี้จะอยู่กึ่งกลางระหว่างสถานะคลายตัวและไม่คลายตัวที่พีเอช 3.0 (Jahn และ Radford, 2008) หรือเรียกว่าเกิดการคลายตัวบางส่วน (Partial folding state) ซึ่งเทียบได้กับสถานะ Intermediate ของกระบวนการคลายตัว 3 ขั้นตอนของโปรตีน แต่เมื่อเทียบกับกระบวนการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติโดยกรดของโปรตีนจะถือว่าไฟโคไซยานินที่พีเอช 3.0 อยู่ในสถานะคลายตัว (Staniforth, Bigotti, Cutruzzola, Allocatelli และ Brunori, 1998)

5.4.2 ผลของความร้อนและพีเอช

จากตารางที่ 5.2 และรูปที่ 5.5 จะพบว่า ที่พีเอชต่ำกว่า 5.0 ค่าอัตราส่วน A620/A370 เปลี่ยนแปลงลดลง (เครื่องหมาย -) โดยผลของพีเอชมากกว่าร้อยละ 45 โดยที่ ที่พีเอช 3.0 จะมีค่าลดลงถึงร้อยละ 77 และภายหลังให้ความร้อนอย่างต่อเนื่องจาก 30 ถึง 68 องศาเซลเซียสนาน 240 วินาที ค่าอัตราส่วน A620/A370 ในช่วงพีเอชดังกล่าวยังลดลงจากค่าเริ่มต้นของแต่ละระดับพีเอชอีกถึงร้อยละ 53-56 แต่ที่พีเอช 6.0 ภายหลังให้ความร้อนค่าอัตราส่วน A620/A370 ลดลงถึงร้อยละ 91 ในขณะที่ที่พีเอช 5.0 ค่าอัตราส่วน A620/A370 ลดลงร้อยละ 7 โดยผลของพีเอช และลดลงอีกร้อยละ 71 ภายหลังให้ความร้อน

เมื่อพิจารณาจากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตรซึ่งสัมพันธ์กับการจัดเรียงโมเลกุลของไฟโคไซยานิน จากตารางที่ 5.3 จะพบว่าที่พีเอช 4.5 ค่าการดูดกลืนแสงมีค่าสูงขึ้นโดยผลของพีเอช และมีค่าสูงขึ้นอีกหลังให้ความร้อน แต่ที่พีเอช 4.0 ค่าการดูดกลืนแสงของไฟโคไซยานินมีค่าสูงขึ้นโดยผลของพีเอชแต่มีค่าลดลงหลังให้ความร้อน ที่พีเอช 3.0 ค่าการดูดกลืนแสงของไฟโคไซยานินมีค่าลดต่ำลงมากที่สุดทั้งโดยผลของพีเอชและความร้อน ส่วนที่พีเอช 6.0 ค่าการดูดกลืนแสงของไฟโคไซยานินจะลดลงโดยผลของความร้อนมากถึงร้อยละ 44 ในขณะที่ที่พีเอช 5.0 ค่าการดูดกลืนแสงของไฟโคไซยานินมีค่าลดลงเพียงเล็กน้อยโดยผลของพีเอชและความร้อน ดังนั้นจากการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 และค่าอัตราส่วน A620/A370 บ่งชี้ว่าไฟโคไซยานินจะทนต่อความร้อนได้ดีที่สุดที่พีเอช 5.0

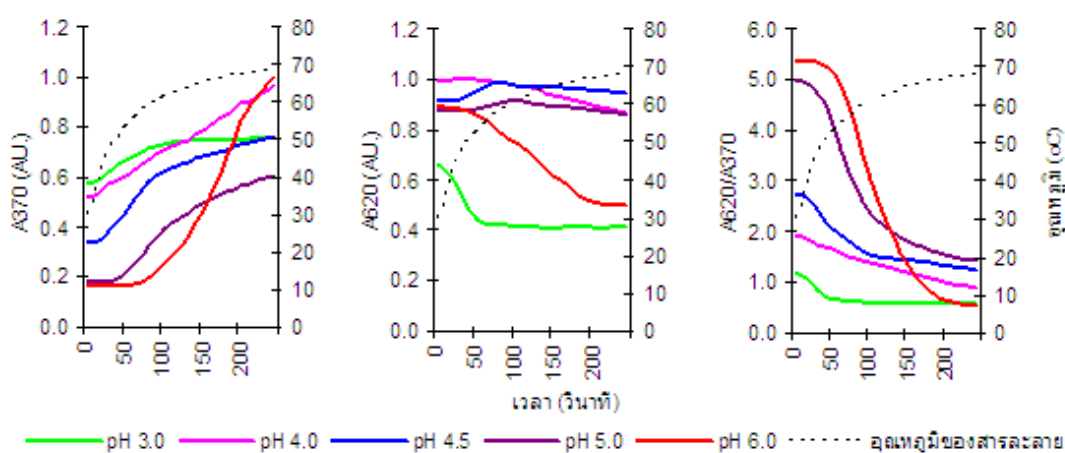
ตารางที่ 5.2 การเปลี่ยนแปลงค่าอัตราส่วน A620/A370 ก่อนและหลังให้ความร้อนที่ระดับพีเอชแตกต่างกัน

ค่าพีเอช	เริ่มต้น (t= 0 วินาที)		เวลา t = 240 วินาที	
	A620/A370	การเปลี่ยนแปลง ⁽¹⁾ (ร้อยละ)	A620/A370	การเปลี่ยนแปลง ⁽²⁾ (ร้อยละ)
3.0	1.23	-76.96 ⁽³⁾	0.57	-53.59
4.0	1.94	-63.75	0.88	-54.40
4.5	2.87	-46.39	1.26	-56.11
5.0	4.97	-7.02	1.42	-71.44
6.0	5.35	0.00	0.49	-90.75

⁽¹⁾ การเปลี่ยนแปลงของค่า A620/A370 ที่พีเอชใดๆ เมื่อเทียบกับที่พีเอช 6.0

⁽²⁾ การเปลี่ยนแปลงของค่า A620/A370 ที่เวลา t=240 วินาที เมื่อเทียบกับค่าเริ่มต้นที่พีเอชใดๆ

⁽³⁾ เครื่องหมายลบ (-) แสดงการเปลี่ยนแปลงลดลง



รูปที่ 5.5 การเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงของไฟโคไซยานินที่ความยาวคลื่น 620 และ 370 นาโนเมตร และการเปลี่ยนแปลงค่า A620/A370 ระหว่างการให้ความร้อนที่อุณหภูมิเพิ่มอย่างต่อเนื่องจาก 30–68 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 5.3 การเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงของไฟโคไซยานินที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร ก่อนและหลังให้ความร้อนที่ระดับพีเอชแตกต่างกัน

ค่าพีเอช	เริ่มต้น (t= 0 วินาที)		เวลา t = 240 วินาที	
	A620	การเปลี่ยนแปลง ⁽¹⁾ (ร้อยละ)	A620	การเปลี่ยนแปลง ⁽²⁾ (ร้อยละ)
3.0	0.664	-25.29 ⁽³⁾	0.407	-38.72
4.0	0.993	11.73	0.862	-13.19
4.5	0.920	3.60	0.944	2.59
5.0	0.879	-1.07	0.859	-2.28
6.0	0.888	0.00	0.500	-43.73

⁽¹⁾ การเปลี่ยนแปลงของค่า A620 ที่พีเอชใดๆ เมื่อเทียบกับที่พีเอช 6.0

⁽²⁾ การเปลี่ยนแปลงของค่า A620 ที่เวลา t=240 วินาที เมื่อเทียบกับค่าเริ่มต้นที่พีเอชใดๆ

⁽³⁾ เครื่องหมายลบ (-) แสดงการเปลี่ยนแปลงลดลง

การเพิ่มขึ้นและการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ 370 และ 620 นาโนเมตร ตามลำดับนั้นบ่งชี้ว่าไฟโคไซยานินที่ได้รับความร้อนจะเกิดการคลายตัว ซึ่งความร้อนมีผลในการทำลายพันธะไฮโดรเจนบนโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีน (Alpha helix secondary structure) และพันธะไฮโดรเจนระหว่างไฟโคไซยานโนไบลิน กับกรดอะมิโนแอสพาดิกบนหน่วยย่อยของไฟโคไซยานิน ดังอธิบายในหัวข้อ 3.1 ซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการจัดเรียงโมเลกุลของไฟโคไซยานินและไฟโคไซยานโนไบลิน และส่งผลต่อสีของไฟโคไซยานินซึ่งสัมพันธ์กับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

ที่พีเอชใกล้ค่าพีเอชของไฟโคไซยานิน แรงผลักทางไฟฟ้าระหว่างโมเลกุลจะมีค่าต่ำ ดังนั้นไฟโคไซยานินจะรวมตัวเป็นกลุ่ม (Barns และ MacColl, 1989) ซึ่งการรวมตัวดังกล่าวมีผลให้ไฟโคไซยานินทนความร้อนได้มากขึ้น Kao, Edwards และ Barns (1975) รายงานว่าที่ช่วงพีเอชดังกล่าว ไฟโคไซยานินที่เจือจางมากๆ (0.1–0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จะรวมตัวเป็นไตรเมอร์และเฮกซะเมอร์ แต่ที่ความเข้มข้นในช่วงดังกล่าว ที่พีเอช 3.9 จะพบเฮกซะเมอร์ และโมโนเมอร์ร้อยละ 67 และ 33 ตามลำดับ ไฟโคไซยานินที่อยู่ในรูปโมโนเมอร์จะไม่เสถียรเมื่อได้รับความร้อน และทนความร้อนได้ต่ำกว่าเมื่อรวมตัวกันอยู่ในรูปที่มีขนาดโมเลกุลสูงกว่า (MacColl และคณะ [1996], Edwards และคณะ [1997] และ Mishra, Shrivastav และ Mishra [2008])

5.5 สรุปผลการวิจัย

เมื่อปรับสภาพพีเอชของสารละลายช่วง 3-6 ไฟโคไซยานินยังคงสามารถรักษาสภาพทางธรรมชาติได้ดีที่พีเอชสูงกว่าหรือเท่ากับ 5.0 ที่พีเอชต่ำกว่า 5 โปรตีนจะเสียสภาพธรรมชาติมากขึ้นตามค่าพีเอชที่ต่ำลง ส่วนผลจากการให้ความร้อนอย่างต่อเนื่องจาก 30 องศาเซลเซียส ถึง 68 องศาเซลเซียส ในเวลา 240 วินาที นั้น บ่งชี้ว่าไฟโคไซยานินที่พีเอช 5.0 มีความคงตัวต่อความร้อนได้ดีที่สุด

5.6 รายการอ้างอิง

- Berns, D.S. and MacColl, R. (1989). Phycocyanin in physical-chemical studies. **Chem. Rev.** 89: 807-825.
- Edwards, M.R., Hauer, C., Stack, R.F., Eisele, L.E. and MacColl, R. (1997). Thermophilic C-phycocyanin: effect of temperature, monomer stability, and structure. **Biochimica et Biophysica Acta.** 1321: 157-164.
- Jahn, T.R. and Radford, S.E. (2008). Folding versus aggregation: Polypeptide conformations on competing pathways. **Archives of Biochemistry and Biophysics.** 469:100-117.
- Kao, O.H.W., Edwards, M.R. and Berns, D.S. (1975) Physical-chemical properties of C-phycocyanin Isolated from an acido-thermophilic eukaryote, *Cyanidium caldarium*. **J. Biochem.** 147: 63-70.
- Kupka, M. and Scheer, H. (2007). Unfolding of C-phycocyanin followed by loss of non-covalent chromophore–protein interactions 1: Equilibrium experiments. **Biochimica et Biophysica Acta.** 1777: 94–103.
- MacColl, R. (1998). Cyanobacterial Phycobilisomes. **J. structural biology.** 124: 311–334.
- MacColl, R., Kapoor, S., Montellese, D.R., Kukadia, S. and Eisele, L.E. (1996). Bilin chromophores as reporters of unique protein conformations of phycocyanin 645. **Biochemistry.** 35: 15436-15439.
- Mishra, S.K., Shrivastav, A. and Mishra, S. (2008). Effect of preservatives for food grade C-PC from *Spirulina platensis*. **Process Biochemistry.** 43: 339-345.
- Patel, A., Mishra, S., Pawar, R. and Ghosh, P.K. (2005). Purification and characterization of C-Phycocyanin from cyanobacterial species of marine and freshwater habitat. **Protein Expression and Purification.** 40: 248 –255.

- Scheer, H. and Kufer, W. (1977). Conformational studies on C-phyococyanin from *Spirulina platensis*. **Z. Naturforsch.** 32C: 513-519.
- Schirmer, T., Bode, W. and Huber, R. (1987). Refined three-dimensional structures of two cyanobacterial C-phyococyanin at 2.1 and 2.5 Å resolution : a common principle of phyococyanin-protein interaction. **J. Mol. Biol.** 196: 677-695.
- Staniforth, R.A., Bigotti, M.G., Cutruzzola, F., Allocatelli, C.T. and Brunori, M. (1998). Unfolding of apomyoglobin from *Aplysia limacine*: the effect of salt and pH on the cooperativity of folding. **J. Mol. Biol.** 275:133-148.
- Topchishvili, L.S., Barbakadze, S.I., Khizanishvili, A.I., Majagaladze, G.V. and Monaselidze, J.R. (2002). Microcalorimetric Study of Iodized and Noniodized Cells and C-Phyococyanin of *Spirulina platensis*. **Biomacromolecules.** 3(3): 415 -420.
- Zarrouk, C. (1966). **Contribution à l'étude d'une cyanophycee: Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima*.** PhD. Thesis, Paris.

บทที่ 6

ผลของมอลโตเดกซ์ตริน กลีเซอรอลและมอลติตอล ต่อความคงตัวของไฟโคไซยานินที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอย

6.1 บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของมอลโตเดกซ์ตริน กลีเซอรอลและมอลติตอล ที่มีต่อความคงตัวของไฟโคไซยานินที่ผ่านการทำแห้งโดยใช้ความร้อนแบบพ่นฝอยด้วยอุณหภูมิอากาศร้อนขาเข้าเท่ากับ 150 ± 1 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิอากาศร้อนขาออกเท่ากับ 92 ± 1 องศาเซลเซียส ผลการทดลองพบว่าไฟโคไซยานินที่ไม่มีสารให้ความคงตัวเมื่อผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอย และแบบ แช่เยือกแข็งระเหิดแห้งจะสูญเสียความคงตัวเมื่อพิจารณาจากค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงของ A620/A370 ไปร้อยละ 31.5 และ 5.5 ตามลำดับ การเติมกลีเซอรอลมากกว่า 0.3 กรัมต่อกรัมโปรตีน จะลดความคงตัวของไฟโคไซยานินในระหว่างกระบวนการทำแห้ง ความคงตัวของไฟโคไซยานินที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยและแบบแช่เยือกแข็งระเหิดแห้งจะลดลง เมื่อเพิ่มปริมาณมอลโตเดกซ์ตริน แต่ไฟโคไซยานินที่ทำแห้งแบบพ่นฝอยจะมีความคงตัวมากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณมอลติตอล และสามารถใช้มอลติตอลได้ถึง 1.71 กรัมต่อกรัมโปรตีนเมื่อใช้ร่วมกับมอลโตเดกซ์ตริน 2 กรัมต่อกรัมโปรตีน

6.2 บทนำ

ไฟโคไซยานินเป็นโปรตีนซึ่งพบในไฟโคบิลิโชมของสาหร่ายกลุ่มไซยาโนแบคทีเรีย มีหน้าที่ในการเก็บเกี่ยวพลังงานจากแสงแดดเพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์แสง สารที่ให้สีแก่ไฟโคไซยานินมีชื่อเรียกว่าไฟโคไซยาโนไบลิน ซึ่งเกาะอยู่บนอะโปโปรตีนโครงสร้างหลักของไฟโคไซยานิน

การจัดเรียงโมเลกุลของไฟโคไซยาโนไบบินบนโมเลกุลโปรตีนของไฟโคไซยานินเกี่ยวข้องกับเกิดสะพานเกลือหรือพันธะเกลือระหว่างโซ่ข้างโพธิ์ไอออนิกบนโมเลกุลของไฟโคไซยาโนไบลินกับอาร์จินีนหรือไลซีนบนโมเลกุลโปรตีนของไฟโคไซยานิน และพันธะไฮโดรเจนระหว่างกรดแอสพาทิกบนโมเลกุลโปรตีนของไฟโคไซยานินกับไนโตรเจนบนโมเลกุลของไฟโคไซยาโนไบลิน ซึ่งทำให้โมเลกุลของไฟโคไซยาโนไบลินถูกตรึงให้อยู่ในลักษณะคลัสเตอร์โมเลกุลเป็นแนวตรง (Schirmer, Bode และ Huber, 1987) ในสภาพดังกล่าว ไฟโคไซยาโนไบลินจะดูดกลืน

แสงในช่วงคลื่นแสงที่ตามองเห็น (Visible) ได้สูงกว่าโมเลกุลที่อยู่ในรูปม้วนเป็นวง (Scheer และ Kufer, 1977)

พันธะไฮโดรเจนและพันธะเกลือจะถูกทำลายได้ด้วยความร้อน ซึ่งส่งผลให้เกิดการคลายตัวของโครงสร้างโปรตีนและการจัดเรียงโมเลกุลของไฟโคไซยานินไบลิน การคลายตัวของโปรตีนทำให้ไฟโคไซยานินสูญเสียสภาพทางธรรมชาติ ซึ่ง Topchishvili และคณะ (2002) พบว่า ไฟโคไซยานินจะสูญเสียสภาพทางธรรมชาติที่อุณหภูมิ 65.2 องศาเซลเซียส ในขณะที่โปรตีนชนิดอื่นๆ ที่ปนอยู่ในสารละลายไฟโคไซยานินจะสูญเสียสภาพทางธรรมชาติที่อุณหภูมิต่ำกว่า 65 องศาเซลเซียส

การใช้สารให้ความคงตัวจะช่วยลดและป้องกันการการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติของโปรตีนระหว่างการทำให้แห้งและการเก็บรักษาได้ ซึ่งไฟโคไซยานินที่ทำให้อยู่ในรูปเข้มข้น อาจทำให้คงตัวได้โดยการเติมเกลือและน้ำตาล (Rebeller, 1982) ส่วนกรณีการผลิตไฟโคไซยานินชนิดผง สามารถใช้น้ำตาลซูโครส น้ำตาลแอลกอฮอล์ (Polyols) เด็กซ์แทรน (Dextran) เกลือ สารพอลิเมอร์ และตัวทำละลายร่วม (Co-solvents) เป็นสารให้ความคงตัวได้ (Cubiciotti [1997] และ Haque, Singha, Moosavi-Movahedi และ Ahmad [2005]) สารเหล่านี้จะเข้าไปแทนที่โมเลกุลของน้ำระหว่างที่น้ำถูกกำจัดออกไป โดยการก่อพันธะไฮโดรเจนกับโครงสร้างของโปรตีนส่วนที่มีขั้วและห่อหุ้มโมเลกุลของโปรตีน สารให้ความคงตัวที่อยู่ในรูปอสัณฐาน (Amorphous state) จะก่อพันธะไฮโดรเจนได้ดีที่สุด (Arakawa, Prestrelski, Kenney และ Carpenter [2001] และ Costantino, Curley, Wu และ Hsu [1998])

มอลโตเดกซ์ตรินเป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่นิยมใช้เป็นสารช่วยในการทำแห้ง (Drying aid) สำหรับสารละลายที่มีกรดหรือน้ำตาลเป็นองค์ประกอบอยู่มาก เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นผงแห้งไม่เหนียว (Adhikari, Howes, Bhandari และ Troung, 2004) ส่วนกลีเซอรอล ซอร์บิทอล และมอลติตอล เป็นสารในกลุ่มน้ำตาลแอลกอฮอล์ ที่นำมาใช้เป็นสารให้ความคงตัวแก่โปรตีนและเอนไซม์ที่ต้องเก็บรักษาด้วยการแช่เยือกแข็งหรือการทำแห้ง ซึ่งในงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาปริมาณมอลโตเดกซ์ตริน กลีเซอรอลและมอลติตอล ที่เหมาะสมต่อการทำแห้งไฟโคไซยานินแบบพ่นฝอย

6.3 วิธีดำเนินการวิจัย

6.3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

ใช้สารห่วยจากข้อ 4.3.2 ในบทที่ 4

มอลโตเดกซ์ตรินเป็นชนิดผงใช้สำหรับอาหารซึ่งมีค่าสมมูลย์เดกซ์โตรสเท่ากับ 10 ผลิตโดยบริษัท Tate & Lyle ประเทศอังกฤษ

กลีเซอรอลเป็นชนิดที่ใช้สำหรับงานวิเคราะห์ (ACS-for analysis grade) ผลิตโดยบริษัท Carlo Erba Reagenti ประเทศอิตาลี

มอลติตอลไซรัป (Maltitol syrup) ความเข้มข้นร้อยละ 65 ได้จากบริษัทสยามชอร์บิทอลจำกัด ประเทศไทย

6.3.2 วิธีเตรียมตัวอย่างสารละลายไฟโคไซยานิน

ผสมสารละลายกับโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 7.0 ให้ได้ปริมาณของแข็งทั้งหมดประมาณร้อยละ 7 จากนั้นทำให้เซลล์สารละลายแตกโดยการแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง แล้วนำมาทำให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง โดยทำซ้ำ 2 รอบ แล้วนำไปแช่ที่ความเร็ว 170 รอบต่อนาที นาน 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 12 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 13,000 RCF ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ทำซ้ำจนกว่าจะได้สารละลายไฟโคไซยานินที่มีค่าความบริสุทธิ์เท่ากับ 1.0 โดยคำนวณจากค่าสัดส่วนระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร และ 280 นาโนเมตร (Rito-Palomares, Nuñez และ Amador, 2001) และมีค่า A620/A370 ซึ่งบ่งบอกระดับความคงตัวเริ่มต้นของไฟโคไซยานินในสารละลาย (Berns และ MacColl, 1989) มากกว่าหรือเท่ากับ 5.0 จากนั้นปรับค่า พีเอชเป็น 6.0 ซึ่งได้ความเข้มข้นของไฟโคไซยานินประมาณ 11 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

6.3.3 การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาผลของมอลโตเดกซ์ทริน กลีเซอรอลและมอลติตอล

คำนวณค่าปริมาณโปรตีนในสารละลายไฟโคไซยานินจาก 6.3.2 ด้วยวิธีการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร ในหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากสมการที่ 1 ดังนี้

$$\text{ความเข้มข้นของโปรตีน} = (1.55 \times A_{280}) - (0.76 \times A_{260}) \quad \dots(1)$$

จากนั้นเตรียมตัวอย่างตามแผนการทดลองที่ได้จากการวางแผนแบบ Rotatable central composite design ดังตารางที่ 6.1 และ 6.2 โดยใช้สารละลายไฟโคไซยานิน การทดลองละ 120 มิลลิลิตร ดังนี้

6.3.3.1 การศึกษาผลของกลีเซอรอลและมอลติตอล

ละลายมอลโตเดกซ์ทรินในสารละลายไฟโคไซยานินจากข้อ 6.3.2 ด้วยอัตราส่วน มอลโตเดกซ์ทริน 2 กรัมต่อโปรตีน 1 กรัม จากนั้นผสมกลีเซอรอลและมอลติตอลในสารละลายไฟโคไซยานินผสมมอลโตเดกซ์ทรินที่เตรียมไว้ เพื่อให้ได้อัตราส่วนระหว่างกลีเซอรอล

และมอลติตอลต่อปริมาณโปรตีนตามปริมาณที่กำหนดในตารางที่ 6.1 คนให้ละลายเข้ากันดี ทิ้งไว้ 30 นาที ก่อนนำไปทำแห้ง

6.3.3.2 การศึกษาผลของมอลโตเดกซ์ตรินและมอลติตอล

ละลายมอลโตเดกซ์ตรินและมอลติตอลในสารละลายไฟโคไซยานินจาก ข้อ 6.3.2 ด้วยอัตราส่วนตามตารางที่ 6.2 ที่อุณหภูมิห้อง ทิ้งไว้ 30 นาที ก่อนนำไปทำแห้ง

สำหรับตัวอย่างควบคุม ใช้สารละลายไฟโคไซยานินจากข้อ 6.3.2 ไปทำแห้งโดยไม่ต้องเติมสารให้ความคงตัว

ตารางที่ 6.1 แผนการทดลองเพื่อศึกษาผลของกลีเซอรอลและมอลติตอล

การทดลอง	ปริมาณสารให้ความคงตัว (กรัมต่อกรัมโปรตีน)	
	กลีเซอรอล	มอลติตอล
1	0.3	0.3
2	0.9	0.3
3	0.3	0.9
4	0.9	0.9
5	0.18	0.6
6	1.02	0.6
7	0.6	0.18
8	0.6	1.02
9	0.6	0.6
10	0.6	0.6
11	0.6	0.6

ตารางที่ 6.2 แผนการทดลองเพื่อศึกษาผลของมอลโตเดกซ์ตรินและมอลติตอล

การทดลอง	ปริมาณสารให้ความคงตัว (กรัมต่อกรัมโปรตีน)	
	มอลโตเดกซ์ตริน	มอลติตอล
1	2	0.5
2	6	0.5
3	2	1.5
4	6	1.5
5	1.17	1
6	6.83	1
7	4	0.29
8	4	1.71
9	4	1
10	4	1
11	4	1

6.3.4 การทำแห้ง

6.3.4.1 การทำแห้งแบบพ่นฝอย

นำตัวอย่างที่เตรียมในข้อ 6.3.3 มาทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบพ่นแห้ง GEA Niro A/S รุ่น S80 ขนาด 4 ลิตร สำหรับห้องปฏิบัติการ ใช้หัวพ่น (Atomizer) แบบขับเคลื่อนด้วยแรงดันลม (Air turbine wheel drive rotary) ซึ่งทำงานที่ความดันของหัวพ่น 1.3-2.0 บาร์ ตั้งอุณหภูมิลมร้อนเข้าที่ 150 องศาเซลเซียส และควบคุมอัตราการไหลของตัวอย่างที่อัตรา 10-15 มิลลิลิตรต่อนาทีเพื่อให้ได้อุณหภูมิขาออกเท่ากับ 92 ± 0.5 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างบรรจุในถุงสุญญากาศ แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6.3.4.2 การทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งระเหิดแห้ง

นำตัวอย่างที่เตรียมในข้อ 6.3.3 ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -40 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง แล้วนำไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งระเหิดแห้ง (GEA Lyophil GmbH รุ่น LYOVAC® GT2-S) นาน 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างบรรจุในถุงสุญญากาศ แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6.3.5 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของตัวอย่างหลังการทำแห้ง

ก่อนนำตัวอย่างไปทำแห้ง นำตัวอย่างจากทุกการทดลองไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ Biochrom รุ่น Libra S22 UV/VIS โดยวิธีกราฟค่าความยาวคลื่น ในช่วงความยาวคลื่น 250–750 นาโนเมตร โดยทำการเจือจางตัวอย่างในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร พีเอช 7.0

สำหรับตัวอย่างที่ผ่านการทำแห้ง ให้ชั่งตัวอย่างปริมาณเท่ากันละลายในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร พีเอช 7.0 ทำให้ละลายแล้วทิ้งไว้ 30 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของไฟโคไซยานินโดยใช้ค่าอัตราส่วน A620/A370 และเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงของค่าอัตราส่วนดังกล่าวเป็นค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงของ A620/A370 ตามสมการที่ 2

$$\begin{aligned} & \text{ร้อยละการเปลี่ยนแปลงของ A620/A370 (\% loss of A620/A370)} \\ & = 100[(A620/A370)_{\text{ก่อนทำแห้ง}} - (A620/A370)_{\text{หลังทำแห้ง}}] / (A620/A370)_{\text{ก่อนทำแห้ง}} \quad \text{--- (2)} \end{aligned}$$

6.4 ผลการทดลองและการอภิปรายผล

6.4.1 ผลของกลีเซอรอลและมอลติตอลต่อความคงตัวของไฟโคไซยานินทำแห้งแบบพ่นฝอย

ที่อัตราส่วนมอลติตอลต่อเดกซ์ตริน 2 กรัมต่อกรัมโปรตีน พบว่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงของ A620/A370 ของไฟโคไซยานินหลังการทำแห้งโดยใช้ความร้อนแบบพ่นฝอยเมื่อเทียบกับก่อนการทำแห้งจะสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเพิ่มปริมาณกลีเซอรอล แต่ปริมาณมอลติตอลให้ผลต่อค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงของ A620/A370 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ผลดังกล่าวบ่งชี้ว่าความคงตัวของไฟโคไซยานินจะลดลงตามปริมาณกลีเซอรอลที่เพิ่มขึ้น แต่มอลติตอลในปริมาณที่ใช้ในการทดลองไม่มีผลต่อความคงตัวของไฟโคไซยานิน แต่อย่างไรก็ตามค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงของ A620/A370 ของไฟโคไซยานินหลังการทำแห้งโดยใช้ความร้อนแบบพ่นฝอยดังกล่าว มีความสัมพันธ์กับปริมาณกลีเซอรอลและมอลติตอลดังสมการที่ 3 และรูปที่ 6.1

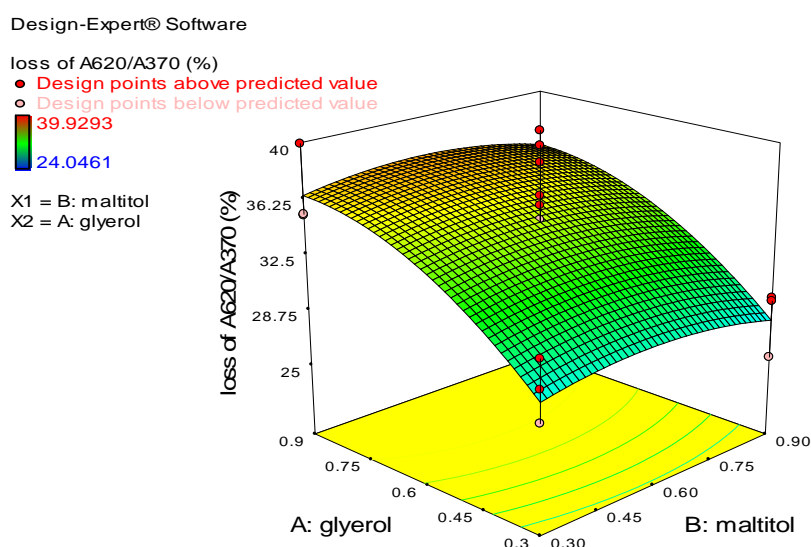
$$\begin{aligned} & \text{ร้อยละการเปลี่ยนแปลงของ A620/A370} \\ & = 16.08 + [38.34 \times (\text{กลีเซอรอล})] + [12.72 \times (\text{มอลติตอล})] - [20.80 \times (\text{กลีเซอรอล})^2] \\ & \quad - [11.17 \times (\text{มอลติตอล})^2] \quad \text{--- (3)} \end{aligned}$$

6.4.2 ผลของมอลโตเดกซ์ตรินและมอลติตอลต่อความคงตัวของไฟโคไซยานินทำแห้งแบบพ่นฝอย

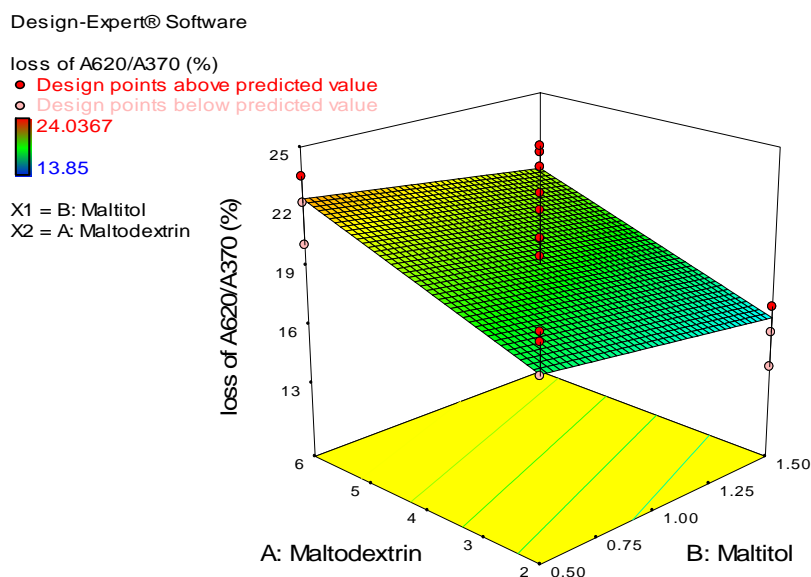
จากการทดลองพบว่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงค่า A620/A370 ของไฟโคไซยานิน ภายหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอยเมื่อเทียบกับก่อนการทำแห้งจะสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเพิ่มปริมาณมอลโตเดกซ์ตริน แต่ปริมาณมอลติตอลให้ผลต่อค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงของ A620/A370 ไม่แตกต่างกันทางสถิติ บ่งชี้ว่าความคงตัวของไฟโคไซยานินจะลดลงตามปริมาณมอลโตเดกซ์ตรินที่เพิ่มขึ้น แต่มอลติตอลในปริมาณที่ใช้ในการทดลองไม่มีผลต่อความคงตัวของไฟโคไซยานิน ค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงของ A620/A370 ของไฟโคไซยานินหลังการทำแห้งแบบพ่นฝอยดังกล่าว มีความสัมพันธ์กับปริมาณมอลโตเดกซ์ตรินและมอลติตอลแบบเส้นตรงดังสมการที่ 4 และรูปที่ 6.2

ร้อยละของการเปลี่ยนแปลง A620/A370

$$= 19.63 + [0.86 \times (\text{มอลโตเดกซ์ตริน})] - [2.09 \times (\text{มอลติตอล})] \quad \text{--- (4)}$$



รูปที่ 6.1 ผลตอบสนองเชิงพื้นผิวของความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงของ A620/A370 ปริมาณกลีเซอรอล และปริมาณมอลติตอล ของไฟโคไซยานินที่ทำแห้งแบบพ่นฝอย



รูปที่ 6.2 ผลตอบสนองเชิงพื้นผิวของความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลง
ของ A620/A370 ปริมาณมอลโตเดกซ์ตริน และปริมาณมอลติตอล ของไฟโคไซยานิน
หลังทำแห้งแบบพ่นฝอย

การเปลี่ยนแปลงของ A620/A370 ของตัวอย่างที่ใช้มอลโตเดกซ์ตรินร่วมกับมอลติตอล (รูปที่ 6.1) ต่ำกว่าตัวอย่างควบคุมซึ่งไม่ได้ผสมสารให้ความคงตัว (ตารางที่ 6.3) แต่ตัวอย่างที่เติมกลีเซอรอล 0.3 กรัมต่อกรัมโปรตีนจะให้ค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงของ A620/A370 ใกล้เคียงกับตัวอย่างควบคุม และจะให้ค่าสูงกว่าตัวอย่างควบคุมเมื่อปริมาณกลีเซอรอลสูงขึ้น (รูปที่ 6.1) จากงานของ Hill, Shalaev และ Zograf (2005) พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของกลีเซอรอลจะมีผลให้อุณหภูมิการเสียสภาพธรรมชาติ (T_d) ของผงโปรตีนแห้งลดต่ำลง และความคงตัวของผงโปรตีนจะลดลงตามค่าอุณหภูมิการเปลี่ยนจากสถานะคล้ายแก้ว (T_g) ที่ลดลงของสาร ที่เป็นส่วนผสมในสูตร (Bell และ Hageman, 1996) สอดคล้องกับคุณสมบัติของกลีเซอรอลซึ่งมีค่าอุณหภูมิการเปลี่ยนจากสถานะคล้ายแก้วประมาณ -92 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 6.3 ค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงของ A620/A370 ของตัวอย่าง

วิธีการทำแห้ง	ร้อยละการเปลี่ยนแปลงค่า A620/A370 *
แบบปั่นฝอย(ควบคุม)	31.54±2.58 ^a
มอลโตเดกซ์ตริน (2 กรัม ต่อกรัม โปรตีน)	18.98±0.11 ^b
Maltitol (0.5 กรัม ต่อกรัม โปรตีน)	15.89±0.10 ^{bc}
แบบแช่เยือกแข็งระเหิดแห้ง (ควบคุม)	5.50±1.68 ^d
มอลโตเดกซ์ตริน (2 กรัม ต่อกรัม โปรตีน)	15.41±0.28 ^c
Maltitol (0.5 กรัม ต่อกรัม โปรตีน)	3.56±0.10 ^d

* ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $p < 0.05$

แม้ว่าจากสมการที่ 3 ปริมาณมอลโตเดกซ์ตรินควรจะมีค่าต่ำ แต่จากการทดลองพบว่าเมื่อใช้มอลโตเดกซ์ตริน 1.17 กรัมต่อกรัมโปรตีนจะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสมบัติการไหล (Flow ability) ต่ำ เป็นผลให้ผงไฟโคไซยานินตกค้างในระบบท่อ และเก็บตัวอย่างจากโถเก็บตัวอย่างได้ยาก ดังนั้น ปริมาณมอลโตเดกซ์ตรินที่เหมาะสมจึงไม่ควรเกิน 2 กรัมต่อกรัมโปรตีนและควรมีอัตราใกล้เคียงกับ 2 กรัมต่อกรัมโปรตีน และแม้ว่าเมื่อใช้มอลดิทอลร่วมกับมอลโตเดกซ์ตริน มอลดิทอลจะทำให้การเปลี่ยนแปลงของ A620/A370 ลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณมอลดิทอล สอดคล้องกับรายงานของ Cobos และ Estrada (2003) ซึ่งพบว่าเอนไซม์ไซลานเนส (Xylanase) จะมีความคงตัวต่อความร้อนสูงขึ้นเมื่อใช้น้ำตาลแอลกอฮอล์ที่มีหมู่ไฮดรอกซีมากขึ้นและใช้ปริมาณมากขึ้น เนื่องจากมอลดิทอลมีหมู่ไฮดรอกซีถึง 9 หมู่ต่อโมเลกุล

6.4.3 ผลของมอลโตเดกซ์ตรินและมอลดิทอลต่อไฟโคไซยานินทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งระเหิดแห้ง

จากการทดลองพบว่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงของ A620/A370 ของไฟโคไซยานินหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งระเหิดแห้งเมื่อเทียบกับก่อนการทำแห้งมีค่าสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเพิ่มปริมาณมอลโตเดกซ์ตริน บ่งชี้ว่าความคงตัวของไฟโคไซยานินจะลดลงตามปริมาณมอลโตเดกซ์ตรินที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงของ A620/A370 มีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเพิ่มปริมาณมอลดิทอล บ่งชี้ว่าความคงตัวของไฟโคไซยานินจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มมอลดิทอล นอกจากนี้ยังพบว่าค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงของ A620/A370 ของไฟโคไซยานินหลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งระเหิดแห้งดังกล่าวสูงกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (ตารางที่ 6.3) ซึ่งบ่งชี้ว่าความคงตัวของไฟโคไซยานินที่ผ่านการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

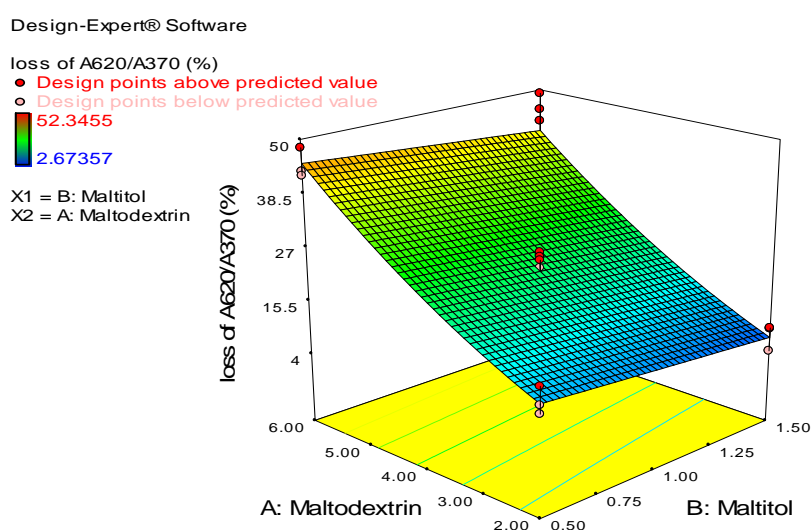
ระเหิดแห้งจะลดลงเมื่อเพิ่มมอลติตอล ค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงของ A620/A370 มีความสัมพันธ์กับปริมาณมอลโตเดกซ์ตรินและมอลติตอล ดังสมการที่ 5 และรูปที่ 6.3

ร้อยละของการเปลี่ยนแปลง A620/A370

$$= 5.87 + (2.83 \times [\text{มอลโตเดกซ์ตริน}]) - (4.42 \times [\text{มอลติตอล}])$$

$$+ (0.68 \times [\text{มอลโตเดกซ์ตริน}]^2)$$

--- (5)



รูปที่ 6.3 ผลตอบสนองเชิงพื้นผิวของความสัมพันธ์ระหว่างค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงของ

A620/A370 ปริมาณมอลโตเดกซ์ตริน และปริมาณมอลติตอลของไฟโคไซยานินที่ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งระเหิดแห้ง

6.5 สรุปผลการทดลอง

ไฟโคไซยานินที่ไม่เติมสารให้ความคงตัว หลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย และแบบแช่เยือกแข็งระเหิดแห้ง ค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงของ A620/A370 จะมีค่าเป็น 31.5 และ 5.5 ตามลำดับ เมื่อใช้กลีเซอรอลร่วมกับมอลโตเดกซ์ตริน กลีเซอรอลไม่ช่วยให้ความคงแก่ไฟโคไซยานินในระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยเมื่อใช้มากกว่า 0.3 กรัมต่อกรัมโปรตีน การทำแห้งไฟโคไซยานินแบบพ่นฝอยและแบบแช่เยือกแข็งระเหิดแห้งควรใช้มอลโตเดกซ์ตริน 1.5-2 กรัมต่อกรัมโปรตีน เนื่องจากว่าที่ระดับดังกล่าวนอกจากจะให้ผลต่อความคงตัวที่ดีแล้วยังให้สมบัติ การไหลที่ดีแก่ไฟโคไซยานินผงอีกด้วย

ไฟโคไซยานินจะมีความคงตัวมากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณมอลติตอล และสามารถใช่มอลติตอลได้ถึง 1.71 กรัมต่อกรัมโปรตีนเมื่อใช้ร่วมกับ มอลโตเดกซ์ตริน 2 กรัมต่อกรัมโปรตีน

6.6 รายการอ้างอิง

- Adhikari, B., Howes, T., Bhandari, B.R., and Troung, V. (2004). Effect of addition of maltodextrin on drying kinetics and stickiness of sugar and acid-rich foods during convective drying: experiments and modeling. **J. Food Engineering**. 62: 53–68.
- Arakawa, T., Prestrelski, S.J., Kenney, W.C. and Carpenter, J.F. (2001). Factors affecting short-term and long-term stabilities of proteins. **Advanced Drug Delivery Reviews**. 46: 307-326.
- Bell, L. N. and Hageman, M. J. (1996). Glass transition explanation for the effect of polyhydroxy compounds on protein denaturation in dehydrated solids. **J. Food Sci.** 61(2): 372 – 375.
- Berns, D.S. and MacColl, R. (1989). Phycocyanin in physical-chemical studies. **Chem. Rev.** 89: 807-825.
- Cobos, A. and Estrada, P. (2003). Effect of polyhydroxylic co solvents on the thermostability and activity of xylanase from *Trichoderma reesei* QM 9414. **Enzyme and Microbial Technology**. 33: 810–818.
- Costantino, H.R., Curley, J.G., Wu, S. and Hsu, C.C. (1998). Water sorption behavior of lyophilized protein–sugar systems and implications for solid-state interactions. **International J. Pharmaceutics**. 166: 211–221.
- Cubicciotti, R.S. (1997). Phycobilisomes, derivatives, and uses therefore. **Patent number:** Us005695990A.
- Haque, I., Singha, R., Moosavi-Movahedi, A.A. and Ahmad, F. (2005). Effect of polyol osmolytes on ΔG_D , the Gibbs energy of stabilization of proteins at different pH values. **Biophysical Chemistry**. 117: 1-12.
- Hill, J. J., Shalaeve, E. Y. and Zograf, G. (2005). Thermodynamic and dynamic factors involved in the stability of native protein structure in amorphous solids in relation to levels of hydration. **J. Pharmaceutical Sciences**. 94(8): 1636 – 1667.

- Rebeller, M., Yout, P., and Lonchamp, C. (1982). Process for selectively extracting dyestuffs contained in *Cyanophyceae* the so-extracted dyestuffs and their use, particularly in foodstuffs. **Patent number:** US04320050.
- Rito-Palomares, M., Nuñez, L. and Amador, D. (2001). Practical application of aqueous two-phase systems for the development of a prototype process for C-Phycocyanin recovery from *Spirulina maxima*. **J. Chemical Technology & Biotechnology**. 76(12): 1273–1280.
- Scheer, H. and Kufer, W. (1977). Conformational studies on C-phycocyanin from *Spirulina platensis*. **Z. Naturforsch.** 32C: 513-519.
- Schirmer, T., Bode, W. and Huber, R. (1987). Refined three-dimensional structures of two cyanobacterial C-phycocyanin at 2.1 and 2.5 Å resolution: a common principle of phycocyanin-protein interaction. **J. Mol. Biol.** 196: 677-695.
- Topchishvili, L.S., Barbakadze, S.I., Khizanishvili, A.I., Majagaladze, G.V. and Monaselidze, J.R. (2002). Microcalorimetric study of iodized and noniodized cells and C-Phycocyanin of *Spirulina platensis*. **Biomacromolecules**. 3(3): 415-420.
- Zarrouk, C. (1966). **Contribution a l'etude d'une cyanophyceae: Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima*.** PhD. Thesis, Paris.

บทที่ 7

ผลของสถานะการเก็บรักษาที่มีต่อความคงตัวของ ไฟโคไซยานินผง และความสามารถในการกำจัดอนุมูลอิสระ

7.1 บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของไฟโคไซยานินผงที่ได้จากการทำแห้งโดยใช้ความร้อนแบบพ่นฝอย ซึ่งมีมอลโตเดกซ์ตริน และมอลติตอลเป็นสารให้ความคงตัวในอัตรา 2 กรัม และ 1 กรัมต่อกรัมโปรตีนตามลำดับ เมื่อเก็บไฟโคไซยานินผงในสถานะมีอากาศ และในสถานะเป็นสุญญากาศร้อยละ 80 ที่อุณหภูมิ 35 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าบรรยากาศในการเก็บรักษาไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า A620/A370 ของไฟโคไซยานิน แต่การเปลี่ยนแปลงของค่าดังกล่าว ที่อุณหภูมิทั้งสองจะลดลงตามระยะเวลาการเก็บและเป็นปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงอันดับที่ 1 ซึ่งมีค่าอัตราคงที่เท่ากับ -9×10^{-4} และ -13×10^{-4} ที่อุณหภูมิ 35 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เมื่อศึกษาผลของไฟโคไซยานินต่อดัชนีความคงตัวของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ พบว่าการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติของไฟโคไซยานินผงโดยผลของการทำแห้งและความร้อนไม่มีผลต่อดัชนีความคงตัวของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ ไฟโคไซยานินผงที่ไม่มีสารให้ความคงตัวจะมีประสิทธิภาพในการเพิ่มความคงตัวของน้ำมันมะพร้าวได้ต่ำกว่าไฟโคไซยานินผงที่มีมอลโตเดกซ์ตรินและมอลติตอลเป็นสารให้ความคงตัวอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) จากการศึกษาความสามารถในการจับอนุมูลไฮดรอกซิลและอนุมูลของเหล็ก พบว่า ไฟโคไซยานินที่มีการสูญเสียสภาพธรรมชาติมากกว่าจะจับอนุมูลไฮดรอกซิลได้มากกว่า ตรงข้ามกับความสามารถในการจับอนุมูลของเหล็กซึ่งจะลดน้อยลง

7.2 บทนำ

ไฟโคไซยานินมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ รวมถึงอนุมูลของโลหะ และสามารถป้องกันการออกเสบได้ ไฟโคไซยานินโพลีโนซึ่งมีโครงสร้างเป็นอะโรเมติก มีบทบาทในการกำจัดอนุมูลอิสระ (Bhat และ Madyastha, 2000) แต่อย่างไรก็ตาม Zhou และคณะ (2005) พบว่าไฟโคไซยานินสามารถสร้างอนุมูลไฮดรอกซิลในสถานะที่มีแสงสว่าง และพบว่าไฟโคไซยานินสามารถกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิลได้มากขึ้นเมื่อไฟโคไซยานินสูญเสียสภาพทางธรรมชาติ เขาสรุปว่าเป็นบทบาทของอะโพอรีตีนซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของไฟโคไซยานิน เมื่อไฟโคไซยานินถูกรีดิวซ์

โดยอนุมูลไฮดรอกซิลและอนุมูลเปอร์ออกไซด์จะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ λ_{\max} ลดลงเมื่อให้เวลาในการทำปฏิกิริยาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเพิ่มขึ้น (Bhat และ Madyastha, 2000)

จากการศึกษาของ Bermejo, Pinero และ Villar (2008) พบว่า ไฟโคไซยานิน มีความสามารถในการจับอนุมูลของเหล็ก ซึ่งในระบบที่ไม่มีสาร EDTA อนุมูล Fe^{2+} จะทำปฏิกิริยากับสารไดออกซีไรโบส ได้ผลผลิตเป็นอนุมูลไฮดรอกซี ซึ่งสามารถติดตามการจับอนุมูลของเหล็กได้ โดยติดตามการสลายตัวของไดออกซีไรโบสด้วยวิธี TBA (Mihara และ Uchiyama, 1978) โดยที่ความสามารถดังกล่าวเป็นบทบาทของไฟโคไซยานโนไบลิน

งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษการเปลี่ยนแปลงของไฟโคไซยานินผงเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 35 และ 45 องศาเซลเซียส และความสามารถในการจับอนุมูลอิสระและอนุมูลของเหล็ก รวมทั้งค่าดัชนีความคงตัวของน้ำมัน

7.3 วิธีดำเนินการวิจัย

7.3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

ใช้สารห่วยจากข้อ 4.3.2 ในบทที่ 4

มอลโตเดกซ์ทรินชนิดผงสำหรับอาหารซึ่งมีค่าสมมูลย์เดกซ์โตรสเท่ากับ 10 ผลิตโดยบริษัท Tate & Lyle ประเทศอังกฤษ และมอลติตอลไซรัป ความเข้มข้นร้อยละ 65 จากบริษัท สยามซอร์บิทอลจำกัด

เฟอริกคลอไรด์ (FeCl_3) อีดีทีเอ (Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt: EDTA) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2 30% solution) และกรดแอสคอบิก (L[+]Ascorbic acid) ของบริษัทคาโลเออร์บา (Carlo Erba)

7.3.2 วิธีเตรียมตัวอย่างสารละลายไฟโคไซยานิน

ใช้วิธีเดียวกับหัวข้อ 6.3.2 ในบทที่ 6

7.3.3 วิธีการเตรียมตัวอย่างเพื่อการทำแห้ง

เตรียมตัวอย่างเหมือนกับหัวข้อ 6.3.3.2 ในบทที่ 6 ด้วยอัตราส่วน มอลโตเดกซ์-ทริน 2 กรัม และมอลติตอล 1 กรัมต่อกรัมโปรตีน

7.3.4 การทำแห้ง

ใช้วิธีเดียวกับหัวข้อ 6.3.4.1 และ 6.3.4.2 ในบทที่ 6

7.3.5 การศึกษาผลของสภาวะการเก็บรักษา

ศึกษาผลของสภาวะการเก็บรักษาที่มีต่อความคงตัวของไฟโคไซยานินผง ที่ทำแห้งแบบพ่นฝอย จากข้อ 7.3.4 โดยศึกษาผลของอุณหภูมิที่ 35 และ 45 องศาเซลเซียส เมื่อบรรจุในถุงสุญญากาศเคลือบอลูมิเนียมฟอยล์ ในสภาวะมีอากาศและสภาวะเป็นสุญญากาศร้อยละ 80

7.3.6 วิธีวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของไฟโคไซยานินระหว่างการเก็บรักษา

ก่อนนำตัวอย่างไปทำแห้ง นำตัวอย่างจากทุกสิ่งทดลองไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ Biochrom รุ่น Libra S22 UV/VIS โดยกราฟวัดค่าความยาวคลื่นช่วง 250–750 นาโนเมตร โดยเจือจางในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร (พีเอช 7.0) ให้ได้ความเข้มข้นของไฟโคไซยานิน 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สำหรับตัวอย่างที่ผ่านการทำแห้ง ให้ชั่งตัวอย่างปริมาณเท่ากันละลายในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.1 โมลต่อลิตร (พีเอช 7.0) ให้ได้ความเข้มข้นของไฟโคไซยานิน 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำให้ละลายแล้วทิ้งไว้ 30 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของไฟโคไซยานินโดยใช้ค่า A620/A370 และหาสมการอัตรา (Rate equation) ค่า k ค่า Q_{10} ค่าความไว (Sensitivity) ค่า z และค่าครึ่งอายุของการเปลี่ยนแปลงค่า A620/A370 ตามวิธีในภาคผนวก จ (Earle, 2003)

7.3.7 การศึกษาผลของไฟโคไซยานินต่อความคงตัวของน้ำมัน

ใช้ไฟโคไซยานินผงที่มีและไม่มีสารให้ความคงตัวที่ทำแห้งแบบพ่นฝอย และไฟโคไซยานินผงที่ไม่มีสารให้ความคงตัวที่ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งระเหิดแห้ง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบกับไฟโคไซยานินผงที่มีสารให้ความคงตัวและเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีอากาศและเป็นสุญญากาศร้อยละ 80 ศึกษาโดยวิเคราะห์ดัชนีความคงตัวของน้ำมัน (Oil stability index: OSI) ด้วยเครื่อง Metrohm 743 Rancimat[®] ซึ่งควบคุมการทำงานโดยใช้เครื่องคอมพิวเตอร์ ด้วยโปรแกรม Rancimat 743 ตามวิธีของกลุ่มเครื่อง โดยเตรียมตัวอย่างในรูปสารแขวนลอยของไฟโคไซยานินผงร้อยละ 1 2 และ 3 ในน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ (Virgin coconut oil) ด้วยอัตราส่วนน้ำหนักต่อน้ำหนัก ให้ได้ปริมาณสุทธิ 3 กรัม (± 0.2 กรัม) ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปวิเคราะห์ทันที โดยหาค่าดัชนีความคงตัวของน้ำมันที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส ด้วยอัตราเร็วของอากาศ 2.5 มิลลิลิตรต่อวินาที และใช้น้ำปราศจากอนุมูลสำหรับรองรับไอสารระเหยของแต่ละตัวอย่างปริมาณ 60 มิลลิลิตร (ค่าความสามารถในการนำไฟฟ้าต่ำกว่า 5 ไมโครซีเมนส์ต่อเซนติเมตร)

7.3.8 การเกิดอันตรกิริยาระหว่างไฟโคไซยานินกับอนุมูลไฮดรอกซี (Interaction of Phycocyanin with Hydroxyl Radicals)

ศึกษาการเกิดอันตรกิริยาระหว่างไฟโคไซยานินกับอนุมูลไฮดรอกซีโดยดัดแปลงวิธีการของ Estrada, Bescos และ Fresno (2001) และ Bhat และ Madyastha (2000) โดยเตรียมส่วนผสมให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเฟอริคคลอไรด์ อีดีทีเอ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และกรดแอสคอบิก เป็น 0.1 0.1 1.0 และ 0.1 มิลลิโมลาร์ ตามลำดับ และไฟโคไซยานิน 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลาร์ ที่ค่าพีเอช 7.4 ให้ได้ปริมาตรรวม 3 มิลลิลิตร โดยการผสมเฟอริคคลอไรด์และอีดีทีเอให้เข้ากันแล้วเติมไฟโคไซยานิน ผสมให้เข้ากันจากนั้นเติมสารผสมระหว่างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกรดแอสคอบิก ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของไฟโคไซยานินทันทีด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ Biocrhom รุ่น Libra S22 UV/VIS ในช่วงความยาวคลื่น 250–750 นาโนเมตร โดยใช้สารผสมที่ไม่มีไฟโคไซยานินเป็นสารละลายอ้างอิง และเตรียมสารละลายไฟโคไซยานินที่มีความเข้มข้นเดียวกันในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 20 มิลลิโมลต่อลิตร ที่พีเอช 7.4 สำหรับวัดค่าเริ่มต้นของแต่ละตัวอย่าง

7.3.9 การศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูลของเหล็ก (Iron-chelating assay)

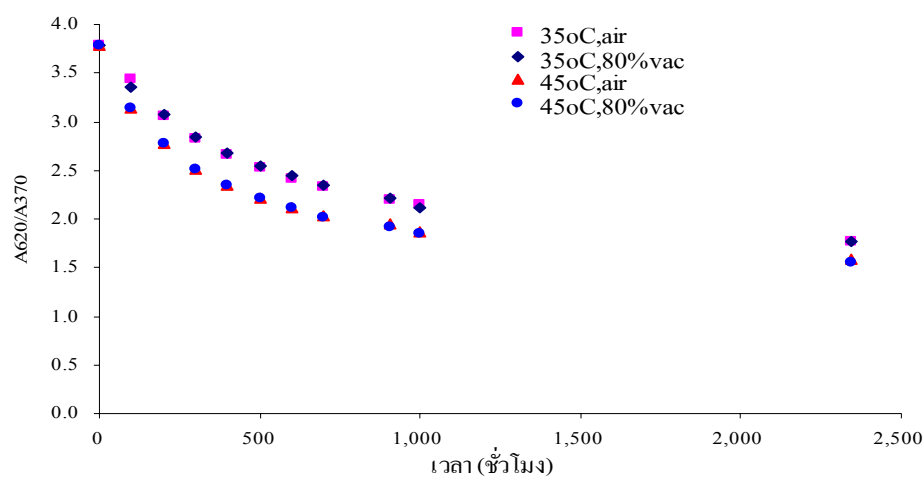
ทำการทดลองโดยดัดแปลงวิธีของ Bermejo, Pinero และ Villar (2008) โดยวัดสเปกตรัมการดูดกลืนแสงของไฟโคไซยานินที่ความเข้มข้น 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อไม่มีและมีเฟอริคคลอไรด์ ที่ระดับความเข้มข้น 94 259 398 และ 517 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยนำส่วนผสมที่เตรียมได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยเขย่าอย่างต่อเนื่องนาน 15 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ Biocrhom รุ่น Libra S22 UV/VIS ในช่วงความยาวคลื่น 250–750 นาโนเมตร

7.4 ผลการทดลอง และการอภิปรายผล

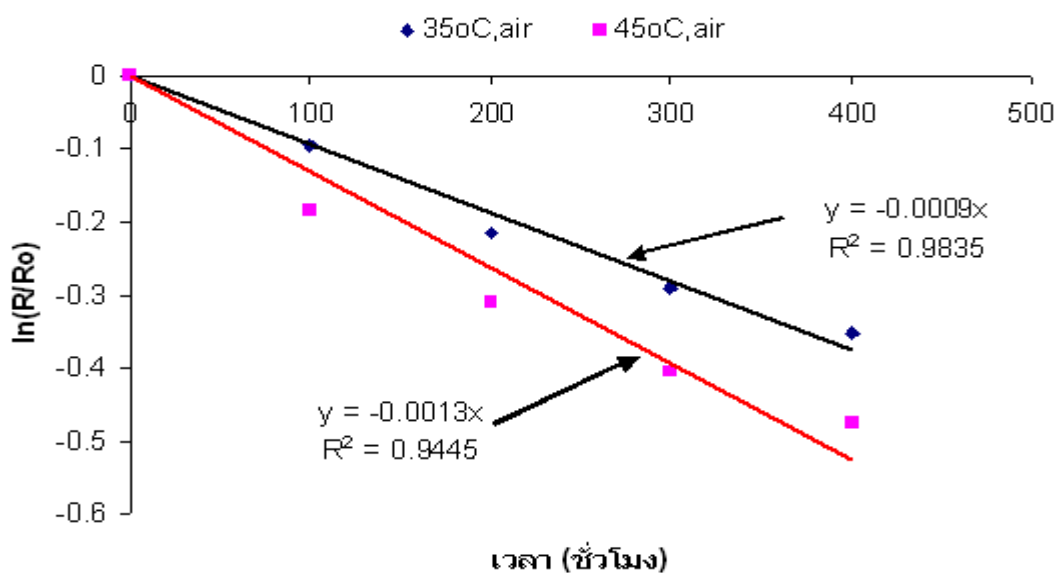
7.4.1 ผลของสภาวะการเก็บรักษา

จากการทดลองพบว่าอัตราส่วน A620/A370 ของไฟโคไซยานินพบมีค่าลดลงตามระยะเวลาการเก็บ (รูปที่ 7.1) มีสมการอัตราของการเปลี่ยนแปลงเป็นสมการอันดับที่ 1 ค่าคงที่อัตราของทั้งสองสภาวะที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสมีค่าเท่ากับ -9×10^{-4} ต่อชั่วโมง และที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสมีค่าเท่ากับ -13×10^{-4} ต่อชั่วโมง (รูปที่ 7.2) ค่า Q_{10} เท่ากับ 1.44 ความไวของการเปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับความร้อนมีค่าร้อยละ 3.7 ต่อองศาเซลเซียส ค่า z เท่ากับ 62.6 องศาเซลเซียส

และคำนวณค่าครึ่งอายุของการเปลี่ยนแปลงค่า A620/A370 ที่อุณหภูมิ 35 และ 45 องศาเซลเซียส ได้เท่ากับ 770 และ 533 ชั่วโมง ตามลำดับ



รูปที่ 7.1 การเปลี่ยนแปลงค่าอัตราส่วน A620/A370 ของไฟโคไซยานินผงเมื่อเก็บในสภาวะมีอากาศและเป็นสุญญากาศร้อยละ 80 ที่อุณหภูมิ 35 และ 45 องศาเซลเซียส



รูปที่ 7.2 สมการอัตราของการเปลี่ยนแปลงค่าอัตราส่วน A620/A370 ของไฟโคไซยานินผงเมื่อเก็บในสภาวะมีอากาศและเป็นสุญญากาศร้อยละ 80 ที่อุณหภูมิ 35 และ 45 องศาเซลเซียส

7.4.2 ผลของไฟโคไซยานินต่อดัชนีความคงตัวของน้ำมัน

จากการทดลองพบว่าดัชนีความคงตัวของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 2.59 ชั่วโมง (± 0.07) และต้องใช้ไฟโคไซยานินผงมากกว่าร้อยละ 2 จึงจะทำให้ดัชนีความคงตัวของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่ไฟโคไซยานินผงซึ่งมีสารให้ความคงตัวผสมอยู่ด้วย จะทำให้ดัชนีความคงตัวของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์เพิ่มขึ้นมากกว่า 2 เท่า เมื่อใช้เพียงร้อยละ 1 และค่าดังกล่าวจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณไฟโคไซยานินซึ่งมีสารให้ความคงตัวผสมอยู่ด้วย แต่การเปลี่ยนแปลงของไฟโคไซยานินจากการทำแห้ง เมื่อดูจากค่า A620/A370 (ดังอธิบายในบทที่ 5) ตัวอย่างจากการศึกษาในข้อ 7.3.1 ซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ไม่มีผลต่อดัชนีความคงตัวของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ (ตารางที่ 7.1)

ในขณะที่ตัวอย่างไฟโคไซยานินผง (ไม่มีสารให้ความคงตัว) ที่ได้จากการทำแห้งแบบพ่นฝอย ($A620/A370 = 3.37$) และที่ได้จากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งระเหิดแห้ง ($A620/A370 = 4.56$) จะให้ค่าดัชนีความคงตัวของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ไม่แตกต่างกัน บ่งชี้ว่าการเปลี่ยนแปลงของไฟโคไซยานินจากการทำแห้ง ซึ่งมีค่า A620/A370 ต่ำลงนั้น ไม่มีผลต่อค่าดัชนีความคงตัวของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์

ตารางที่ 7.1 ผลของไฟโคไซยานินต่อค่าดัชนีความคงตัวของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส

ตัวอย่าง	Induction time (ชั่วโมง) *
น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์	2.59±0.07 ^c
น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ ผสมกับไฟโคไซยานินผงจากการทำแห้งแบบพ่นฝอย ⁽¹⁾	
ร้อยละ 1 ของน้ำมัน ⁽²⁾	2.73±0.15 ^c
ร้อยละ 2 ของน้ำมัน	3.03±0.11 ^{de}
ร้อยละ 3 ของน้ำมัน	3.73±0.16 ^d
น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ ผสมกับไฟโคไซยานินผงจากการทำแห้งแบบพ่นฝอย ⁽³⁾	
ร้อยละ 1 ของน้ำมัน	5.64±0.14 ^c
ร้อยละ 2 ของน้ำมัน	10.19±0.45 ^b
ร้อยละ 3 ของน้ำมัน	13.06±0.98 ^a
น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ ผสมกับไฟโคไซยานินผงจากการทำแห้งแบบพ่นฝอย ⁽⁴⁾	
ร้อยละ 1 ของน้ำมัน เก็บที่อุณหภูมิ 45°C ในสภาวะมีอากาศ นาน	
384 ชั่วโมง	5.63±0.01 ^c
908 ชั่วโมง	5.59±0.21 ^c
น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ ผสมกับไฟโคไซยานินผงจากการทำแห้งแบบพ่นฝอย ⁽⁴⁾	
ร้อยละ 1 ของน้ำมัน เก็บที่อุณหภูมิ 45°C ในสภาวะเป็นสุญญากาศร้อยละ 80 นาน	
384 ชั่วโมง	5.84±0.17 ^c
908 ชั่วโมง	6.16±0.04 ^c
น้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ ผสมกับไฟโคไซยานินผง	
จากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งระเหิดแห้ง ⁽¹⁾ ร้อยละ 3 ของน้ำมัน	3.45±0.04 ^{de}

⁽¹⁾ ไม่มีสารให้ความคงตัว และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

⁽²⁾ นำหนักต่อนำหนัก

⁽³⁾ มีสารให้ความคงตัว และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

⁽⁴⁾ มีสารให้ความคงตัว

* ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $p<0.05$

การวิเคราะห์ดัชนีความคงตัวของไขมันโดยใช้เครื่อง Rancimat เป็นการศึกษาความคงตัวของไขมันโดยพิจารณาจากระยะเวลาที่ใช้ไป จนทำให้เครื่องสามารถตรวจวัดสารซึ่งผลผลิตจากการ

เกิดออกซิเดชันของไขมันได้ เรียกว่า Induction time เป็นวิธีทดสอบการเกิดออกซิเดชันของไขมันแบบเร่งในสถานะที่มีอุณหภูมิสูงโดยทั่วไปจะกระทำที่อุณหภูมิ 70–160 องศาเซลเซียส ขึ้นกับความคงตัวของน้ำมันชนิดนั้นๆ จากการทดลองนี้ใช้อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส เนื่องจาก Induction time ของน้ำมันมะพร้าวมีค่าสูงมาก ซึ่ง ณ อุณหภูมิดังกล่าวจะทำให้ไฟโคซานินเกิดการเสียสภาพทางธรรมชาติ ดังนั้น ผลของไฟโคซานินที่มีต่อความคงตัวของน้ำมันมะพร้าว จึงเป็นผลของไฟโคซานินที่เสียสภาพทางธรรมชาติแล้ว ซึ่ง Zhou และคณะ (2005) พบว่าไฟโคซานินที่เสียสภาพทางธรรมชาติจะมีความสามารถในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิลได้มากขึ้น

7.4.3 ความสามารถในการจับอนุมูลไฮดรอกซิลของไฟโคซานิน

เมื่อไฟโคซานินจับกับอนุมูลไฮดรอกซิลจะทำให้ค่า A620 เปลี่ยนแปลงในทิศทางต่ำลง จากการทดลองพบว่าในตัวอย่างที่ไม่มีสารให้ความคงตัว ค่า A620 จะมีอัตราการเปลี่ยนแปลงตามคุณสมบัติของตัวอย่าง (ดูจากค่า A620/A370 ในตารางที่ 7.2) ก่อนการทดลองโดยที่ ค่า A620 จะมีอัตราการเปลี่ยนแปลงลดลงมากขึ้นในตัวอย่างที่มีค่า A620/A370 เริ่มต้นต่ำลง (มีความคงตัวต่ำลง)

เมื่อเปรียบเทียบตัวอย่างไฟโคซานินที่ผ่านการทำแห้งแบบพ่นฝอยระหว่างตัวอย่างที่มีและไม่มีสารให้ความคงตัว พบว่าตัวอย่างที่มีสารให้ความคงตัวจะให้อัตราการลดลงของค่า A620 ต่ำกว่าถึง 2.5 เท่า กล่าวคือ มีความสามารถในการจับอนุมูลไฮดรอกซิลได้ต่ำกว่า ในขณะที่ตัวอย่างที่มีสารให้ความคงตัวที่ได้จากการศึกษาในข้อ 7.3.1 ซึ่งเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จะให้อัตราการลดลงของค่า A620 มากขึ้นเมื่อเก็บนานขึ้น บ่งชี้ว่า ความสามารถในการจับอนุมูลไฮดรอกซิลของไฟโคซานินจะเพิ่มขึ้นตามค่าอัตราส่วน A620/A370 ที่ลดลงของตัวอย่าง ซึ่งค่าอัตราส่วน A620/A370 ที่ลดลง มีสัมพันธ์กับการสูญเสียสภาพธรรมชาติของไฟโคซานินดังคำอธิบายในบทที่ 5 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhou และคณะ (2005)

ตารางที่ 7.2 การเปลี่ยนแปลงของไฟโคไซยานินเมื่อทำปฏิกิริยากับอนุมูลไฮดรอกซิล

ตัวอย่างไฟโคไซยานิน	A620/A370 ⁽⁴⁾	อัตราเปลี่ยนแปลงลดลง ของค่า A620* (ร้อยละ)
สารละลายไฟโคไซยานินสด	5.37	26.20 ^c
ไฟโคไซยานินผงจากการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งระเหิดแห้ง ⁽¹⁾	4.56	35.44 ^b
ไฟโคไซยานินผงจากการทำแห้งแบบพ่นฝอย ⁽¹⁾	3.37	45.57 ^a
ไฟโคไซยานินผงจากการทำแห้งแบบพ่นฝอย ⁽²⁾	3.78	17.72 ^d
ไฟโคไซยานินผงจากการทำแห้งแบบพ่นฝอย ⁽³⁾	2.68	33.59 ^b
เก็บที่ 45°C และมีอากาศ นาน 384 ชั่วโมง		
ไฟโคไซยานินผงจากการทำแห้งแบบพ่นฝอย ⁽³⁾	2.19	36.37 ^b
เก็บที่ 45°C และมีอากาศ นาน 908 ชั่วโมง		

⁽¹⁾ ไม่มีสารให้ความคงตัว และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

⁽²⁾ มีสารให้ความคงตัว ที่เวลา t=0 ก่อนนำไปทดสอบการเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

⁽³⁾ มีสารให้ความคงตัว

⁽⁴⁾ ค่า A620/A370 ของไฟโคไซยานินที่นำมาทดสอบ

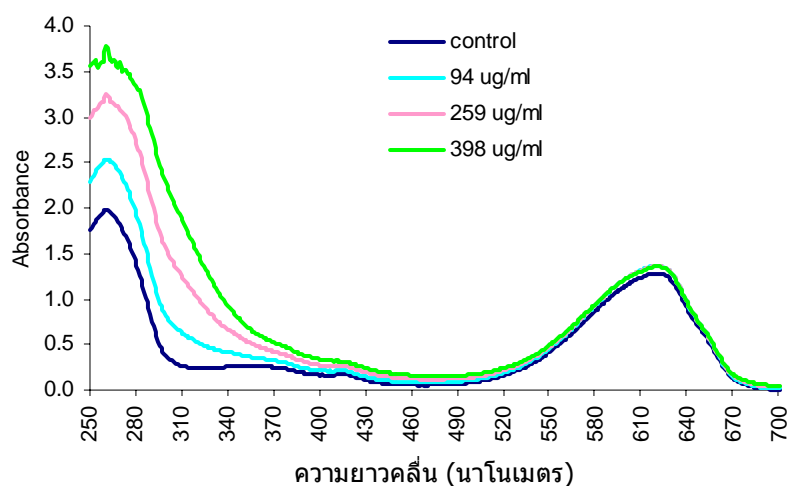
* ตัวอักษรที่ต่างกันหมายถึงมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $p < 0.05$

7.4.4 ความสามารถของไฟโคไซยานินในการจับอนุมูลของเหล็ก

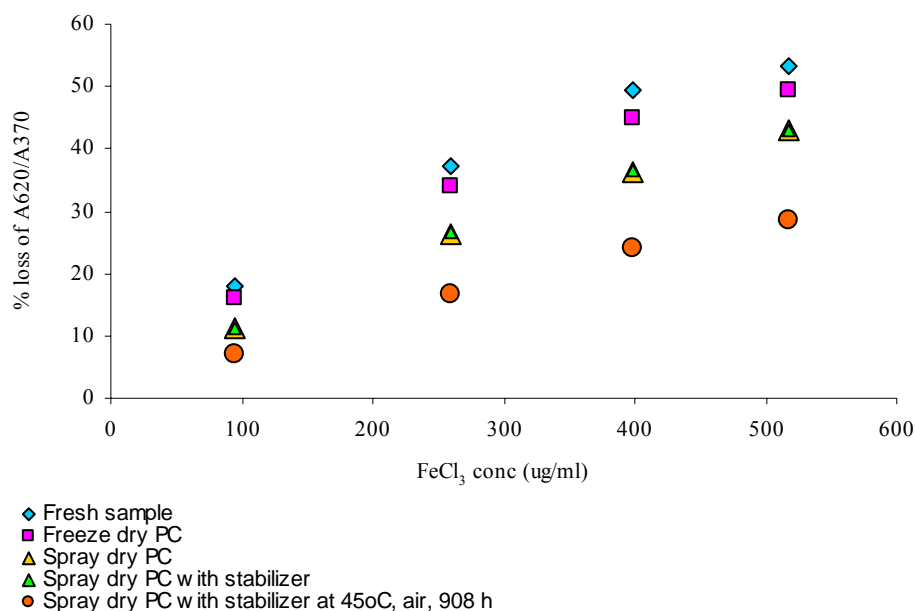
ส่วนประกอบที่เป็นอะโรเมติก และหมู่คาร์บอกซิลของไฟโคไซยานินไบลิน และกรดอะมิโนบนโปรตีนโครงสร้างหลักของไฟโคไซยานิน มีบทบาทหลักในการจับกับอนุมูลของเหล็ก (Bermejo, Pinero และ Villar, 2008) เมื่อไฟโคไซยานินจับกับอนุมูลของเหล็กจะทำให้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 370 นาโนเมตรเปลี่ยนแปลงไป แต่ไม่มีผลต่อค่าการดูดกลืนแสงที่ 620 นาโนเมตร (รูปที่ 7.3) เป็นผลให้ค่า A620/A370 ของทุกตัวอย่างลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของอนุมูลของเหล็ก จาก 94 ถึง 517 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้ไฟโคไซยานิน 0.2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 7.4) กล่าวคือ ไฟโคไซยานินจะมีความคงตัวต่ำลงเมื่อจับกับอนุมูลของเหล็กมากขึ้น แต่การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีแนวโน้มลดลงเมื่อความเข้มข้นของเฟอร์ริกคลอไรด์สูงกว่า 398 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากผลการทดลองในบทที่ 5 รูปที่ 5.4 ซึ่งพบว่า ค่า Emission intensity ของไฟโคไซยานินจะลด

ต่ำลงเมื่อค่า A620/A370 ลดลง สอดคล้องกับผลของ Bermejo และคณะ (2008) ซึ่งพบว่า ค่า Emission intensity ของไฟโคไซยานินจะลดต่ำลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเพอริคลอไรด์

จากรูปที่ 7.4 ซึ่งใช้ตัวอย่างที่แตกต่างกัน 5 ตัวอย่าง กล่าวคือ ไฟโคไซยานินสด (Fresh sample) ไฟโคไซยานินผงที่ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งระเหิดแห้ง ไฟโคไซยานินผงจากการทำแห้งแบบพ่นฝอยโดยไม่เติมสารให้ความคงตัว ไฟโคไซยานินผงจากการทำแห้งแบบพ่นฝอยที่เติมสารให้ความคงตัวที่เวลา $t=0$ ก่อนนำไปทดสอบการเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และไฟโคไซยานินผงจากการทำแห้งแบบพ่นฝอยที่เติมสารให้ความคงตัวที่เวลา $t=908$ ชั่วโมงของการเก็บที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่า A620/A370 ดังในตารางที่ 7.2 ให้แนวโน้มในการจับอนุมูลของเหล็กไม่แตกต่างกัน แต่ด้วยอัตราที่แตกต่างกัน กล่าวคือ ตัวอย่างที่มีค่า A620/A370 เริ่มต้นสูงกว่า เมื่อทำปฏิกิริยากับอนุมูลของเหล็ก จะให้ค่าการเปลี่ยนแปลงของไฟโคไซยานินเมื่อดูจากค่า A620/A370 สูงกว่า



รูปที่ 7.3 ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายไฟโคไซยานินเมื่อทำปฏิกิริยากับอนุมูลของเหล็กที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน



รูปที่ 7.4 ความสามารถของไฟโคไซยานินในการจับอนุมูลของเหล็ก

7.5 สรุปผลการวิจัย

การเก็บในสภาวะมีอากาศและเป็นสุญญากาศร้อยละ 80 ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า A620/A370 ของไฟโคไซยานินผงซึ่งมีมอลโตเดกซ์ตรินและมอลติตอลเป็นสารให้ความคงตัว (อัตราส่วนมอลโตเดกซ์ตริน 2 กรัม มอลติตอล 1 กรัมต่อกรัมโปรตีน) การเปลี่ยนแปลงค่า A620/A370 ของไฟโคไซยานินที่อุณหภูมิทั้งสองจะลดลงตามระยะเวลาการเก็บ และเป็นปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงอันดับที่ 1 ซึ่งมีค่าอัตราคงที่เท่ากับ -9×10^{-4} และ -13×10^{-4} ที่อุณหภูมิ 35 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับไฟโคไซยานินผงโดยผลของการทำแห้งและความร้อนไม่มีผลต่อดัชนีความคงตัวของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ ไฟโคไซยานินผงที่ไม่มีสารให้ความคงตัวมีประสิทธิภาพในการเพิ่มความคงตัวของน้ำมันได้ต่ำกว่าไฟโคไซยานินผงที่มีมอลโตเดกซ์ตรินและมอลติตอลเป็นสารให้ความคงตัว

ไฟโคไซยานินจะจับอนุมูลไฮดรอกซิลได้มากขึ้นตามระดับการเกิดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติที่สูงขึ้นทั้งในกลุ่มที่มีและไม่มีสารให้ความคงตัว แต่ไฟโคไซยานินที่มีสารให้ความคงตัวจะจับอนุมูลไฮดรอกซิลได้ต่ำกว่า

เมื่อเทียบน้ำหนักต่อน้ำหนัก ไฟโคไซยานินสามารถจับอนุมูลของเหล็กได้มากกว่า 2 เท่าของน้ำหนักไฟโคไซยานิน แต่ไฟโคไซยานินที่เกิดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติมากกว่าจะสามารถจับอนุมูลของเหล็กได้น้อยกว่าไฟโคไซยานินที่เกิดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติต่ำกว่า

7.6 รายการอ้างอิง

- Bhat, V. B. and Madyastha, K. M. (2000). C-Phycocyanin: A potent peroxy radical scavenger in vivo and in vitro .**Biochemical and Biophysical Research Communications**. 275: 20-25.
- Bermejo, P., Pinero, E. and Villar, A. M. (2008). Iron-chelating ability and antioxidant properties of phycocyanin isolated from a protean extract of *Spirulina platensis*. **Food chemistry**. 110: 436-445.
- Earle, R.L. and Earle, M.D. (2003). **Fundamentals of food reaction technology**. Cambridge. RSC.
- Mihara, M., and Uchiyama, M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Analytical Biochemistry**. 86(1): 271–278.
- Estrada, J.E.P., Bescos, P.B. and Fresno, A.M.V.D. (2001). Antioxidant activity of different fractions of *Spirulina platensis* Protean extract. *Il Farmaco*. 56:497–500.
- Zarrouk, C. (1966). **Contribution a l'etude d'une cyanophyceae: Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthese de *Spirulina maxima***. PhD. Thesis, Paris.
- Zhou, Z.-P., Liu, L.-N., Chen, X.-L. , Wang, J.-X., Chen, M., Zhang, Y.-Z. and Zhou, B.C. (2005). Factors that effect antioxidant activity of C-Phycocyanin from *Spirulina platensis*. **J. Food Biochemistry**. 29(3): 313-322.

บทที่ 8

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

8.1 การสกัดไฟโคไซยานิน

ในขั้นคัดเลือกสายพันธุ์จากสาหร่ายสไปรูลินา 10 สายพันธุ์จากสถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ คัดสายพันธุ์ที่เหมาะสมโดยพิจารณาจากปริมาณไฟโคไซยานิน และสรีรวิทยาของสาหร่ายได้ 2 สายพันธุ์ คือ *Spirulina platensis* (IFRPD1213) และ *Spirulina maxima* (IFRPD1183)

ในการสกัดไฟโคไซยานินพบว่าคลื่นอัลตราโซนิกทำลายผนังเซลล์ของสาหร่ายได้ดีกว่าวิธี RFT โดยที่ระยะเวลาที่ได้รับคลื่นอัลตราโซนิก ขนาดความสูงของคลื่น ระยะเวลาในการแช่เยือกแข็ง และจำนวนรอบในการแช่เยือกแข็ง มีผลต่อประสิทธิภาพในการทำลายผนังเซลล์ของสาหร่าย

หลังจากการทำลายผนังเซลล์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก เมื่อนำไปสกัดต่อด้วยการเขย่า พบว่าอุณหภูมิและระยะเวลาสกัดมีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดไฟโคไซยานินของทั้งสองสายพันธุ์ โดยที่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะสกัดได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แต่ระหว่างสองสายพันธุ์จะให้ผลการสกัดไม่แตกต่างกันที่อุณหภูมิเท่ากัน

การใช้ไลโซไซม์ร่วมกับการเขย่าอย่างต่อเนื่อง โดยใช้ไลโซไซม์ 9.09 และ 18.17 มิลลิกรัมต่อกรัมของสาหร่าย พบว่าไลโซไซม์ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพในการสกัดของสายพันธุ์ 1183 แต่มีผลต่อประสิทธิภาพในการสกัดของสายพันธุ์ 1213 แต่อย่างไรก็ตาม แม้ว่าปริมาณเอนไซม์จะมีผลต่อการสกัดของสายพันธุ์ 1213 แต่ปริมาณที่สกัดได้เมื่อเทียบกับไม่ใช้เอนไซม์มีความแตกต่างกันเพียงร้อยละ 6.4 สำหรับสายพันธุ์ 1213 แต่ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการสกัดที่เด่นชัดคือ อุณหภูมิ ระยะเวลา และความเข้มข้นของอนุโมลในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ใช้ในการสกัด โดยที่ ที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิที่ให้ประสิทธิภาพในการสกัดสูงสุด โดยใช้เวลาสกัดเพียง 2 ชั่วโมง

ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า สภาวะการสกัดที่เหมาะสม คือการสกัดที่อุณหภูมิ 44 องศาเซลเซียส ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยมีการกวนหรือเขย่าอย่างต่อเนื่อง ซึ่งจะใช้เวลาในการสกัดประมาณ 2-3 ชั่วโมง เพื่อให้ได้ประสิทธิภาพการสกัดประมาณร้อยละ 90

8.2 การทำแห้งไฟโคไชนานิน

จากการศึกษาผลของพีเอชและความร้อนต่อความคงตัวของไฟโคไชนานินในสารละลาย พบว่า ไฟโคไชนานินในสารละลายจะทนต่อความร้อนได้ดีที่สุดที่พีเอช 5.0 แต่ที่พีเอชต่ำกว่าหรือสูงกว่าความคงตัวจะต่ำลง ดังนั้นเพื่อดูผลของสารให้ความคงตัวต่อความคงตัวของไฟโคไชนานินเมื่อผ่านกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยที่อุณหภูมิเข้า 150 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิออก 92 องศาเซลเซียส จึงเตรียมสารละลายไฟโคไชนานินที่พีเอช 6.0 ซึ่งได้ข้อสรุปว่า ไฟโคไชนานินที่ไม่เติมสารให้ความคงตัว หลังการทำแห้งแบบพ่นฝอยและแบบแช่เยือกแข็งระเหิดแห้ง ค่าร้อยละการเปลี่ยนแปลงของ A620/A370 จะมีค่าเป็น 31.5 และ 5.5 ตามลำดับ

เมื่อใช้กลีเซอรอลร่วมกับมอลโตเดกซ์ตริน กลีเซอรอลจะไม่ช่วยให้ความคงตัวของไฟโคไชนานินในระหว่างกระบวนการทำแห้งแบบพ่นฝอยเมื่อใช้มากกว่า 0.3 กรัมต่อกรัมโปรตีน การทำแห้งไฟโคไชนานินแบบพ่นฝอยและแบบแช่เยือกแข็งระเหิดแห้งควรใช้มอลโตเดกซ์ตริน 1.5-2 กรัมต่อกรัมโปรตีน เนื่องจากว่าที่ระดับดังกล่าวนอกจากจะให้ผลต่อความคงตัวที่ดีแล้วยังให้สมบัติการไหลที่ดีแก่ไฟโคไชนานินผงอีกด้วย

ไฟโคไชนานินจะมีความคงตัวมากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณมอลติตอล และสามารถใช้มอลติตอลได้ถึง 1.71 กรัมต่อกรัมโปรตีนเมื่อใช้ร่วมกับมอลโตเดกซ์ตริน 2 กรัมต่อกรัมโปรตีน แต่หากใช้ปริมาณสูงเกินไปจะทำให้ค่า T_g ของไฟโคไชนานินผงต่ำกว่าอุณหภูมิห้อง ซึ่งจะมีผลต่อความคงตัวในระหว่างการเก็บรักษา

แต่อย่างไรก็ตาม แม้ว่าการใช้ชนิดและปริมาณของสารให้ความคงตัวที่เหมาะสมนั้นจะช่วยลดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติของไฟโคไชนานินได้ แต่การสูญเสียก็ยังสูงถึงร้อยละ 25 ซึ่งลดได้ประมาณร้อยละ 5 เมื่อเทียบกับไม่ได้เติมสารให้ความคงตัว แต่สูงกว่าถึงร้อยละ 20 เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งระเหิดแห้ง ดังนั้นในการศึกษาในโอกาสต่อไปจึงควรศึกษาการทำแห้งที่อุณหภูมิต่ำกว่า 150 องศาเซลเซียส ที่พีเอช 5.0 โดยใช้มอลโตเดกซ์ตรินและมอลติตอลเป็นสารให้ความคงตัว เพื่อหาสภาวะที่ทำให้เกิดการเสียดสภาพทางธรรมชาติน้อยที่สุด

8.3 ผลของสภาวะการเก็บรักษาที่มีต่อความคงตัวของสารประกอบไฟโคไชนานินผง

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของไฟโคไชนานินในสภาพมีอากาศ และเป็นสุญญากาศร้อยละ 80 ที่อุณหภูมิ 35 และ 45 องศาเซลเซียส ได้ข้อสรุปว่าสภาวะบรรยากาศไม่มีผลต่อความคงตัวของไฟโคไชนานินผงซึ่งมีมอลโตเดกซ์ตรินและมอลติตอลเป็นสารให้ความคงตัวในอัตรา 2 กรัม และ 1 กรัมต่อกรัมโปรตีน การเปลี่ยนแปลงของไฟโคไชนานินผงที่อุณหภูมิทั้งสองมีปฏิกิริยาการ

เปลี่ยนแปลงอันดับที่ 1 ซึ่งมีค่าคงที่อัตราที่ 35 และ 45 องศาเซลเซียสเท่ากับ -9×10^{-4} และ -13×10^{-4} ต่อชั่วโมง ตามลำดับ

จากการศึกษาผลของไฟโคไซยานินต่อดัชนีความคงตัวของน้ำมัน โดยพิจารณาจากค่า Induction time ที่อุณหภูมิ 150 องศาเซลเซียส ได้ข้อสรุปว่า การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับไฟโคไซยานินผงโดยผลของการทำแห้งและความร้อนไม่มีผลต่อดัชนีความคงตัวของน้ำมันมะพร้าวบริสุทธิ์ ไฟโคไซยานินผงที่ไม่มีสารให้ความคงตัวมีประสิทธิภาพในการเพิ่มความคงตัวของน้ำมันได้ต่ำกว่าไฟโคไซยานินผงที่มีมอลโตเดกซ์ตรินและมอลติตอลเป็นสารให้ความคงตัว

ในขณะที่จากการศึกษาความสามารถในการกำจัดอนุมูลไฮดรอกซิลและไอออนของเหล็ก ได้ข้อสรุปว่า ไฟโคไซยานินจะจับอนุมูลไฮดรอกซิลได้มากขึ้นตามระดับการเกิดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติที่สูงขึ้นทั้งในกลุ่มที่มีและไม่มีสารให้ความคงตัว แต่ไฟโคไซยานินที่มีสารให้ความคงตัว จะจับอนุมูลไฮดรอกซิลได้ต่ำกว่า

เมื่อเทียบน้ำหนักต่อน้ำหนัก ไฟโคไซยานินจะสามารถจับอนุมูลของเหล็กได้มากกว่า 2 เท่าของน้ำหนักไฟโคไซยานิน แต่ไฟโคไซยานินที่เกิดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติมากกว่าจะสามารถจับอนุมูลของเหล็กได้น้อยกว่าไฟโคไซยานินที่เกิดการสูญเสียสภาพทางธรรมชาติต่ำกว่า

ภาคผนวก ก

สูตรอาหาร Zarrouk

องค์ประกอบของสูตรอาหาร Zarrouk ประกอบด้วยสารประกอบชนิดต่างๆ ดังในตารางที่ ก.1 ถึง ก.3 ดังนี้

ตารางที่ ก.1 องค์ประกอบหลักของสูตรอาหาร Zarrouk มาตรฐาน

สารประกอบ	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)
NaHCO_3	16.80
K_2HPO_4	0.50
NaNO_3	2.50
K_2SO_4	1.00
NaCl	1.00
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.20
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.04
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.01
EDTA	0.08
สารละลาย A_5	1 ml
สารละลาย B_6	1 ml

ตารางที่ ก.2 องค์ประกอบของสารละลาย A_5

สารประกอบ	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)
H_3BO_3	2.86
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	1.81
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0.222
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.079
Na_2MoO_4	0.0177

ตารางที่ ก.3 องค์ประกอบของสารละลาย B₆

สารประกอบ	ความเข้มข้น (กรัมต่อลิตร)
NH_4VO_3	22.96
$\text{KCr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	192.00
$\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	44.80
$\text{Na}_2\text{WO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	17.94
$\text{Co}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	43.98

ภาคผนวก ข

ผลวิเคราะห์ความแปรปรวน
ของการศึกษาวิธีที่เหมาะสมในการสกัดไฟโคไซยานินจากสาหร่ายสีไปรุไดนา

ตารางที่ ข.8 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลตอบสนองจากปัจจัยการทดลอง

Source	SS	df	MS	F Value	Prob > F	
Block	5.6E-05	2	2.8E-05			
Model	3.0E-03	5	6.0E-04	19.98	< 0.0001	significant
A-FTC	1.4E-03	1	1.4E-03	48.06	< 0.0001	
B-Ft	4.9E-04	1	4.9E-04	16.44	0.0003	
AB	2.5E-04	1	2.5E-04	8.48	0.0066	
A^2	7.9E-04	1	7.9E-04	26.57	< 0.0001	
B^2	1.9E-04	1	1.9E-04	6.24	0.0180	
Residual	9.3E-04	31	3.0E-05			
Lack of Fit	7.8E-04	19	4.1E-05	3.33	0.0187	significant
Pure Error	1.5E-04	12	1.2E-05			
Cor Total	4.0E-03	38				

Std. Dev.	0.01	R-Squared	0.76	C.V. %	24.33	Pred R-Squared	0.59
Mean	0.02	Adj R-Squared	0.72	PRESS	0.00	Adeq Precision	14.73

ข.3 การทำลายผนังเซลล์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก สำหรับสายพันธุ์ 1213

ตารางที่ ข.9 ปัจจัยและระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง

Factor Name	Low Actual	High Actual	Mean	Std. Dev.
St (sec)	5	20	12.5	5.30
Amp (%)	70	100	85	10.61

ตารางที่ ข.10 ผลตอบสนองจากการทดลอง

Response Name	Obs	Min	Max	Mean	Std. Dev.	Ratio	Trans	Model
EE (%)	36	3.81	15.51	8.84	2.98	4.07	None	2FI
A440	36	0.01	0.04	0.02	0.01	4.81	Sqrt	RQuad

ข.1 การทำลายผนังเซลล์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิกสำหรับสายพันธุ์ 1183

ตารางที่ ข.1 ปัจจัยและระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง

Factor Name	Low Actual	High Actual	Mean	Std. Dev.
St (sec)	5	20	12.5	5.10
Amp (%)	70	100	85	10.19

ตารางที่ ข.2 ผลตอบสนองจากการทดลอง

Response Name	Obs	Min	Max	Mean	Std.Dev.	Ratio	Trans	Model
EE (%)	39	3.03	26.39	15.37	4.79	8.70	None	RQuad
A440	39	0.04	0.38	0.15	0.08	10.76	Log10	RQuad

ข.1.1 ประสิทธิภาพการสกัด

ตารางที่ ข.3 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลตอบสนองจากปัจจัยการทดลอง

Source	SS	df	MS	F Value	Prob > F	
Block	81.46	2	40.73			
Model	611.37	3	203.79	37.49	< 0.0001	significant
A-St	504.11	1	504.11	92.74	< 0.0001	
B-Amp	59.49	1	59.49	10.94	0.0023	
B^2	47.77	1	47.77	8.79	0.0056	
Residual	179.38	33	5.44			
Lack of Fit	106.79	21	5.09	0.84	0.6493	not significant
Pure Error	72.60	12	6.05			
Cor Total	872.21	38				

Std. Dev.	2.33	R-Squared	0.77	C.V. %	15.17	Pred R-Squared	0.69
Mean	15.37	Adj R-Squared	0.75	PRESS	244.94	Adeq Precision	19.57

ข.1.2 ค่า A440

ตารางที่ ข.4 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลตอบสนองจากปัจจัยการทดลอง

Source	SS	df	MS	F Value	Prob > F	
Block	3.53	2	1.77			
Model	5.27	3	1.76	33.07	< 0.0001	significant
A-St (sec)	4.47	1	4.47	84.19	< 0.0001	
B-Amp (%)	0.25	1	0.25	4.66	0.0382	
B^2	0.55	1	0.55	10.37	0.0029	
Residual	1.75	33	0.05			
Lack of Fit	1.20	21	0.06	1.24	0.3564	not significant
Pure Error	0.55	12	0.05			
Cor Total	10.55	38				

Std. Dev.	0.23	R-Squared	0.75	C.V. %	11.28	Pred R-Squared	0.65
Mean	-2.04	Adj R-Squared	0.73	PRESS	2.45	Adeq Precision	23.11

ข.2 การทำลายผนังเซลล์ด้วยวิธี RFT สำหรับสายพันธุ์ 1183

ตารางที่ ข.5 ปัจจัยและระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง

Factor Name	Low Actual	High Actual	Mean	Std. Dev.
FTC (cycle)	1	3	2	0.68
Ft (h)	1	3	2	0.68

ตารางที่ ข.6 ผลตอบสนองจากการทดลอง

Response Name	Obs	Min	Max	Mean	Std.Dev.	Ratio	Trans	Model
EE (%)	39	0.21	16.64	4.60	4.25	77.64	Sqrt	Quad
A440	39	0.01	0.05	0.02	0.01	5.07	None	Quad

ข.2.1 ประสิทธิภาพการสกัด

ตารางที่ ข.7 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลตอบสนองจากปัจจัยการทดลอง

Source	SS	df	MS	F Value	Prob > F	
Block	1.15	2	0.58			
Model	32.76	5	6.55	106.17	< 0.0001	significant
A-FTC	12.00	1	12.00	194.43	< 0.0001	
B-Ft	14.10	1	14.10	228.52	< 0.0001	
AB	3.01	1	3.01	48.85	< 0.0001	
A ²	0.98	1	0.98	15.90	0.0004	
B ²	3.56	1	3.56	57.63	< 0.0001	
Residual	1.91	31	0.06			
Lack of Fit	1.39	19	0.07	1.69	0.1764	not significant
Pure Error	0.52	12	0.04			
Cor Total	35.83	38				

Std. Dev.	0.25	R-Squared	0.94	C.V. %	12.94	Pred R-Squared	0.91
Mean	1.92	Adj R-Squared	0.94	PRESS	3.18	Adeq Precision	34.22

ข.2.2 ถ้า A440

ข.3.1 ประสิทธิภาพการสกัด

ตารางที่ ข.11 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลตอบสนองจากปัจจัยการทดลอง

Source	SS	df	MS	F Value	Prob > F	
Block	1.76	2	0.88			
Model	294.38	3	98.13	195.15	< 0.0001	significant
A-St (sec)	273.26	1	273.26	543.46	< 0.0001	
B-Amp (%)	18.43	1	18.43	36.66	< 0.0001	
AB	2.69	1	2.69	5.34	0.0279	
Residual	15.08	30	0.50			
Lack of Fit	14.06	21	0.67	5.85	0.0048	significant
Pure Error	1.03	9	0.11			
Cor Total	311.23	35				

Std. Dev.	0.71	R-Squared	0.95	C.V. %	8.02	Pred R-Squared	0.92
Mean	8.84	Adj R-Squared	0.95	PRESS	23.98	Adeq Precision	35.76

ข.3.2 ค่า A440

ตารางที่ ข.12 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลตอบสนองจากปัจจัยการทดลอง

Source	SS	df	MS	F Value	Prob > F	
Block	0.0003	2	0.00013			
Model	0.0241	3	0.00804	130.05	< 0.0001	significant
A-St (sec)	0.0224	1	0.02236	361.46	< 0.0001	
B-Amp (%)	0.0016	1	0.00157	25.35	< 0.0001	
B^2	0.0002	1	0.00021	3.36	0.0768	
Residual	0.0019	30	0.00006			
Lack of Fit	0.0014	21	0.00007	1.52	0.2632	not significant
Pure Error	0.0004	9	0.00005			
Cor Total	0.0263	35				

Std. Dev.	0.01	R-Squared	0.93	C.V. %	5.61	Pred R-Squared	0.90
Mean	0.14	Adj R-Squared	0.92	PRESS	0.00	Adeq Precision	29.82

ข.4 การทำลายผนังเซลล์ด้วยวิธี RFT สำหรับสายพันธุ์ 1213

ตารางที่ ข.13 ปัจจัยและระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง

Factor Name	Low Actual	High Actual	Mean	Std. Dev.
FTc (cycle)	1	3	2	0.71
Ft (h)	1	3	2	0.71

ตารางที่ ข.14 ผลตอบสนองจากการทดลอง

Response Name	Obs	Min	Max	Mean	Std. Dev.	Ratio	Trans	Model
EE (%)	36	0.71	4.38	1.85	0.87	6.17	None	Quad
A440	36	0.00	0.04	0.01	0.01	N/A	None	RLinear

ข.4.1 ประสิทธิภาพการสกัด

ตารางที่ ข.15 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลตอบสนองจากปัจจัยการทดลอง

Source	SS	df	MS	F Value	Prob > F	
Block	0.80	2	0.40			
Model	13.31	5	2.66	5.91	0.0008	significant
A-FTc	4.13	1	4.13	9.17	0.0052	
B-Ft	3.38	1	3.38	7.50	0.0106	
AB	1.95	1	1.95	4.32	0.0469	
A^2	1.99	1	1.99	4.43	0.0445	
B^2	3.08	1	3.08	6.85	0.0142	
Residual	12.61	28	0.45			
Lack of Fit	12.56	19	0.66	122.73	< 0.0001	significant
Pure Error	0.05	9	0.01			
Cor Total	26.72	35				

Std. Dev.	0.67	R-Squared	0.51	C.V. %	36.37	Pred R-Squared	0.16
Mean	1.85	Adj R-Squared	0.43	PRESS	21.71	Adeq Precision	8.26

ข.4.2 ค่า A440

ตารางที่ ข.16 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลตอบสนองจากปัจจัยการทดลอง

Source	SS	df	MS	F Value	Prob > F	
Block	0.0004	2	0.00021			
Model	0.0002	1	0.00023	4.76	0.0366	significant
A-FTc	0.0002	1	0.00023	4.76	0.0366	
Residual	0.0016	32	0.00005			
Lack of Fit	0.0014	23	0.00006	4.96	0.0086	significant
Pure Error	0.0001	9	0.00001			
Cor Total	0.0022	35				

Std. Dev.	0.007	R-Squared	0.13	C.V. %	54.16	Pred R-Squared	-0.09
Mean	0.013	Adj R-Squared	0.10	PRESS	0.002	Adeq Precision	6.65

ข.5 การสกัดหลังการทำลายผนังเซลล์ด้วยคลื่นอัลตราโซนิก

ข.5.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและความแตกต่างของค่า EE ของสายพันธุ์ 1183 และ 1213 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ตารางที่ ข.17 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลตอบสนองจากปัจจัยการทดลอง

Source	DF	SS	MS	F	P
Time	4	26555.1	6638.78	76.69	0.0000
Var	1	168.0	168.03	1.94	0.1788
time*var	4	408.5	102.12	1.18	0.3498
Error	20	1731.3	86.57		
Total	29	28863.0			

Grand Mean 61.633 CV 15.10

ตารางที่ ข.18 ผลการเปรียบเทียบชุดการทดลองโดยปัจจัย Time ด้วยวิธี Tukey HSD

Time	Mean	Homogeneous Groups
4	88.17	A
3	84.83	A
2	77.83	A
1	48.00	B
0	9.33	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 5.3717 Critical Q Value 4.232

Critical Value for Comparison 16.075 Error term used: Error, 20 DF

ตารางที่ ข.19 ผลการเปรียบเทียบชุดการทดลองโดยปัจจัยสายพันธุ์ด้วยวิธี Tukey HSD

สายพันธุ์	Mean	Homogeneous Groups
1183	64.00	A
1213	59.27	A

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 3.3974 Critical Q Value 2.951

Critical Value for Comparison 7.0903 Error term used: Error, 20 DF

ตารางที่ ข.20 ผลการเปรียบเทียบชุดการทดลองโดยปัจจัย Time และสายพันธุ์ด้วยวิธี Tukey HSD

Time	สายพันธุ์	Mean	Homogeneous Groups
4	1183	94.67	A
3	1183	90.33	A
4	1213	81.67	A
2	1183	81.00	A
3	1213	79.33	A
2	1213	74.67	AB
1	1213	51.67	BC
1	1183	44.33	C
0	1183	9.67	D
0	1213	9.00	D

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 7.5968 Critical Q Value 5.007

Critical Value for Comparison 26.897 Error term used: Error, 20 DF

ข.5.2 การวิเคราะห์ความแปรปรวนและความแตกต่างของค่า EE ของสายพันธุ์ 1183 ที่อุณหภูมิ 25 และ 37 องศาเซลเซียส

ตารางที่ ข.21 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลตอบสนองจากปัจจัยการทดลอง

Source	DF	SS	MS	F	P
Temp	1	392.0	392.04	8.66	0.0095
Time	3	17372.8	5790.93	127.98	0.0000
Temp*time	3	634.1	211.38	4.67	0.0158
Error	16	724.0	45.25		
Total	23	19123.0			

Grand Mean 52.29 CV 12.86

ตารางที่ ข.22 ผลการเปรียบเทียบชุดการทดลองโดยปัจจัย Temp ด้วยวิธี Tukey HSD

Temp	Mean	Homogeneous Groups
37	56.33	A
25	48.25	B

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 2.7462 Critical Q Value 2.999

Critical Value for Comparison 5.8246 Error term used: Error, 16 DF

ตารางที่ ข.23 ผลการเปรียบเทียบชุดการทดลองโดยปัจจัย Time ด้วยวิธี Tukey HSD

Time	Mean	Homogeneous Groups
3	81.33	A
2	72.00	A
1	43.33	B
0	12.50	C

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 3.8837 Critical Q Value 4.047

Critical Value for Comparison 11.113 Error term used: Error, 16 DF

ตารางที่ ข.24 ผลการเปรียบเทียบชุดการทดลองโดยปัจจัย Temp และ Time ด้วยวิธี Tukey HSD

Temp	Time	Mean	Homogeneous Groups
37	3	90.33	A
37	2	81.00	AB
25	8	72.33	AB
25	5	63.00	BC
37	1	44.33	CD
25	2	42.33	D
25	0	15.33	E
37	0	9.67	E

Alpha 0.05 Standard Error for Comparison 5.4924 Critical Q Value 4.903

Critical Value for Comparison 19.042 Error term used: Error, 16 DF

ข.6 การสกัดร่วมกับการทำลายผนังเซลล์ด้วยไลโซไซม์สำหรับสายพันธุ์ 1183

ตารางที่ ข.25 ปัจจัยและระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง

Factor Name	Low Actual	High Actual	Mean	Std. Dev.
EC (mg/g dw)	0	18.17	9.09	6.59
T (°C)	30	44	37	5.08
Et (h)	1	3	2	0.73

ตารางที่ ข.26 ผลตอบสนองจากการทดลอง

Response Name	Obs	Min	Max	Mean	Std.Dev.	Ratio	Trans	Model
EE (%)	57	8.88	90.95	58.66	21.29	10.24	None	RQuad
a440	57	0.02	0.05	0.04	0.01	2.32	None	RLinear

ข.6.1 ประสิทธิภาพการสกัด

ตารางที่ ข.27 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลตอบสนองจากปัจจัยการทดลอง

Source	SS	df	MS	F Value	Prob > F	
Block	50.11	2	25.06			
Model	24459.92	8	3057.49	162.05	< 0.0001	significant
A-EC (mg/g dw)	30.54	1	30.54	1.62	0.2097	
B-T (oC)	13504.71	1	13504.71	715.78	< 0.0001	
C-Et (h)	8924.24	1	8924.24	473.01	< 0.0001	
AB	123.02	1	123.02	6.52	0.0140	
BC	391.86	1	391.86	20.77	< 0.0001	
A^2	106.00	1	106.00	5.62	0.0220	
B^2	132.74	1	132.74	7.04	0.0109	
C^2	717.31	1	717.31	38.02	< 0.0001	
Residual	867.88	46	18.87			
Lack of Fit	575.75	34	16.93	0.70	0.8029	not significant
Pure Error	292.13	12	24.34			
Cor Total	25377.92	56				

Std. Dev.	4.34	R-Squared	0.97	C.V. %	7.41	Pred R-Squared	0.95
Mean	58.66	Adj R-Squared	0.96	PRESS	1289.39	Adeq Precision	43.86

ข.6.2 ค่าA440

ตารางที่ ข.28 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลตอบสนองจากปัจจัยการทดลอง

Source	SS	df	MS	F Value	Prob > F	
Block	2.93E-05	2	1.47E-05			
Model	6.11E-04	2	3.05E-04	10.77	0.0001	significant
B-T (oC)	4.54E-04	1	4.54E-04	16.02	0.0002	
C-Et (h)	1.57E-04	1	1.57E-04	5.53	0.0226	
Residual	1.47E-03	52	2.84E-05			
Lack of Fit	7.72E-04	40	1.93E-05	0.33	0.9959	not significant
Pure Error	7.03E-04	12	5.85E-05			
Cor Total	2.11E-03	56				

Std. Dev.	0.0053	R-Squared	0.29	C.V. %	14.8196	Pred R-Squared	0.18
Mean	0.0359	Adj R-Squared	0.27	PRESS	0.0017	Adeq Precision	8.90

ข.7 การสกัดร่วมกับการทำลายผนังเซลล์ด้วยไลโซไซม์สำหรับสายพันธุ์ 1213

ตารางที่ ข.29 ปัจจัยและระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง

Factor Name	Low Actual	High Actual	Mean	Std. Dev.
EC (mg/g dw)	0	18.17	9.085	6.77
T (°C)	30	44	37	5.22
Et (h)	1	3	2	0.75

ตารางที่ ข.30 ผลตอบสนองจากการทดลอง

Response Name	Obs	Min	Max	Mean	Std. Dev.	Ratio	Trans	Model
EE (%)	54	0.94	100.51	64.41	27.78	106.90	None	RQuad
a440	54	0.01	0.05	0.03	0.01	5.79	None	2FI

ข.7.1 ประสิทธิภาพการสกัด

ตารางที่ ข.31 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลตอบสนองจากปัจจัยการทดลอง

Source	SS	df	MS	Value	Prob > F	
Block	261.72	2	130.86			
Model	38361.71	5	7672.34	154.56	< 0.0001	significant
A-EC (mg/g dw)	425.86	1	425.86	8.58	0.0053	
B-T (oC)	24687.49	1	24687.49	497.34	< 0.0001	
C-Et (h)	7506.00	1	7506.00	151.21	< 0.0001	
BC	4051.09	1	4051.09	81.61	< 0.0001	
C ²	1691.28	1	1691.28	34.07	< 0.0001	
Residual	2283.40	46	49.64			
Lack of Fit	1399.48	37	37.82	0.39	0.9803	not significant
Pure Error	883.92	9	98.21			
Cor Total	40906.83	53				

Std. Dev.	7.05	R-Squared	0.94	C.V. %	10.94	Pred R-Squared	0.93
Mean	64.41	Adj R-Squared	0.94	PRESS	2999.73	Adeq Precision	39.30

ข.7.2 ค่า A440

ตารางที่ ข.32 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลตอบสนองจากปัจจัยการทดลอง

Source	SS	df	MS	F Value	Prob > F	
Block	3.80E-05	2	1.90E-05			
Model	3.30E-03	6	5.50E-04	25.02	< 0.0001	significant
A-EC (mg/g dw)	4.64E-05	1	4.64E-05	2.11	0.1534	
B-T (oC)	1.78E-03	1	1.78E-03	80.85	< 0.0001	
C-Et (h)	9.70E-04	1	9.70E-04	44.08	< 0.0001	
AB	1.87E-04	1	1.87E-04	8.49	0.0056	
AC	2.46E-04	1	2.46E-04	11.18	0.0017	
BC	7.47E-05	1	7.47E-05	3.40	0.0719	
Residual	9.90E-04	45	2.20E-05			
Lack of Fit	8.36E-04	36	2.32E-05	1.36	0.3260	not significant
Pure Error	1.54E-04	9	1.71E-05			
Cor Total	4.33E-03	53				

Std. Dev.	0.0047	R-Squared	0.77	C.V. %	16.4936	Pred R-Squared	0.64
Mean	0.0284	Adj R-Squared	0.74	PRESS	0.0015	Adeq Precision	21.19

ภาคผนวก ค

วิธีการสร้างกราฟอนุพันธ์อันดับหนึ่ง

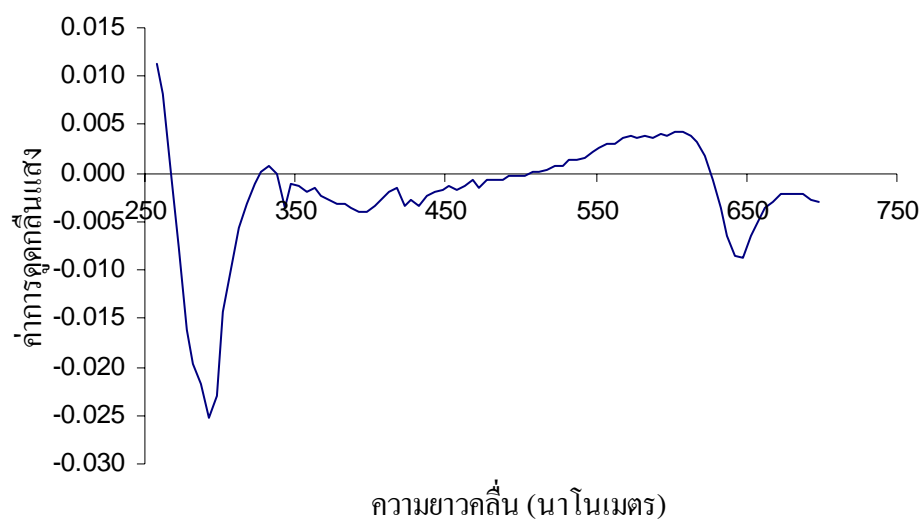
กราฟอนุพันธ์อันดับหนึ่งเป็นกราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงของตัวแปรตามเมื่อตัวแปรต้นเปลี่ยนแปลงไปหนึ่งหน่วยในช่วงใดๆ ของตัวแปรต้น จากข้อมูลความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงความยาวคลื่นตั้งแต่ 250 นาโนเมตรถึง 700 นาโนเมตร ที่ได้จากทดลองสามารถนำมาสร้างกราฟอนุพันธ์อันดับหนึ่งได้ดังนี้

จากข้อมูลในคอลัมน์ A และ B ในรูปที่ ก.1 หาค่าความแตกต่างของค่าความยาวคลื่นระหว่างลำดับที่ติดกันลงในคอลัมน์ D ด้วยสูตรตัวอย่างในคอลัมน์ C แล้วหาค่าความแตกต่างของการดูดกลืนแสงระหว่างลำดับที่ติดกันลงในคอลัมน์ F ด้วยสูตรตัวอย่างในคอลัมน์ E

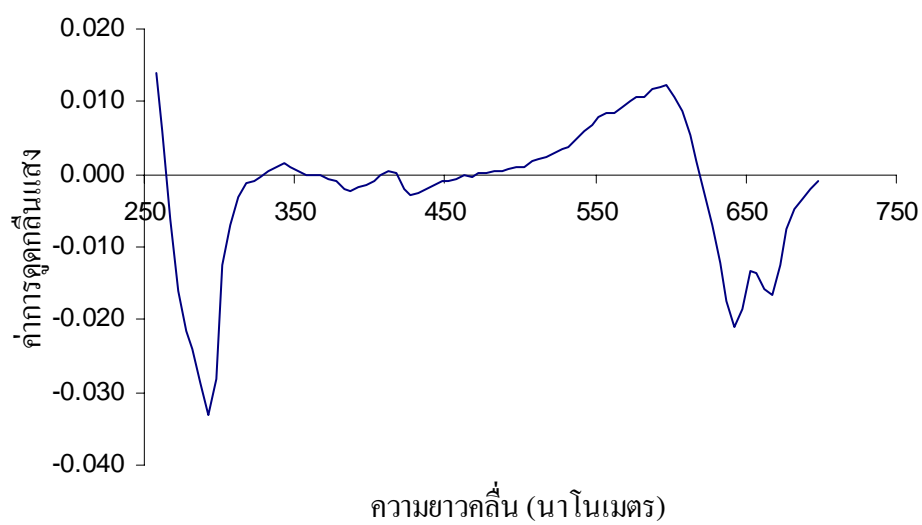
หาค่าอัตราการเปลี่ยนแปลงต่อค่าความยาวคลื่นลงในคอลัมน์ H ด้วยสูตรตัวอย่างในคอลัมน์ G แล้วหาค่าเฉลี่ยของความยาวคลื่นที่จะนำไปใช้ในการสร้างกราฟอนุพันธ์ของช่วงความยาวคลื่นที่อยู่ติดกัน ลงในคอลัมน์ J ด้วยสูตรตัวอย่างในคอลัมน์ I จากนั้นนำค่าเฉลี่ยของความยาวคลื่นและอัตราการเปลี่ยนแปลงต่อค่าความยาวคลื่นจากคอลัมน์ J และ H ไปสร้างกราฟ จะได้กราฟดังรูปที่ ก.2 และ ก.3

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
1											
2	ความยาวคลื่น (นาโนเมตร)	ค่าการดูดกลืนแสง	ความแตกต่าง ของค่าความยาว คลื่น		ความแตกต่างของ ค่าการดูดกลืนแสง		อัตราการเปลี่ยนแปลง ต่อค่าความยาวคลื่น 1 นาโนเมตร		ความยาวคลื่นเฉลี่ย (นาโนเมตร)		
3	255	0.935	=(A4-A3)	5	=(B4-B3)	0.070	=F3/D3	0.014	=(A3+A4)/2	257.5	
4	260	1.005	=(A5-A4)	5	=(B5-B4)	0.030	=F4/D4	0.006	=(A4+A5)/2	262.5	
5	265	1.035		5		-0.030		-0.006		267.5	
6	270	1.004		5		-0.080		-0.016		272.5	
7	275	0.925		5		-0.108		-0.022		277.5	
8	280	0.817		5		-0.120		-0.024		282.5	
9	285	0.696		5		-0.144		-0.029		287.5	
10	290	0.553		5		-0.166		-0.033		292.5	
11	295	0.387		5		-0.141		-0.028		297.5	
12	300	0.246		5		-0.062		-0.012		302.5	
13	305	0.184		5		-0.034		-0.007		307.5	
14	310	0.150		5		-0.016		-0.003		312.5	
15	315	0.135		5		-0.007		-0.001		317.5	
16	320	0.128		5		-0.005		-0.001		322.5	
17	325	0.123		5		-0.001		0.000		327.5	
18	330	0.122		5		0.003		0.001		332.5	
19	335	0.125		5		0.005		0.001		337.5	
20	340	0.130		5		0.007		0.001		342.5	
21	345	0.137		5		0.005		0.001		347.5	
22	350	0.142		5		0.003		0.001		352.5	
23	355	0.145		5		0.000		0.000		357.5	

รูปที่ ก.1 ตัวอย่างการคำนวณด้วยโปรแกรมกระดาคำนวณ



รูปที่ ค.2 ตัวอย่างกราฟอนุพันธ์อันดับ 1 ของสารละลายไฟโคไซยานินที่พีเอช 3.0



รูปที่ ค.3 ตัวอย่างกราฟอนุพันธ์อันดับ 1 ของสารละลายไฟโคไซยานินที่พีเอช 6.0

ภาคผนวก ง

ผลวิเคราะห์ความแปรปรวนของงานวิจัยบทที่ 6

ง.1 ผลของมอลโตเดกซ์ตริน กลีเซอรอลและมอลติตอลต่อค่าอัตราส่วน A620/A370 หลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย

ตารางที่ ง.1 ปัจจัยและระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง

Factor Name	Low Actual	High Actual	Mean	Std. Dev.
glycerol	0.3	0.9	0.6	0.26
maltitol	0.3	0.9	0.6	0.26

ตารางที่ ง.2 ผลตอบสนองจากการทดลอง

Response Name	Obs	Min	Max	Mean	Std. Dev.	Ratio	Trans	Model
Loss of A620/A370 (%)	33	24.05	39.93	33.11	4.42	1.66	None	RQuad

ตารางที่ ง.3 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลตอบสนองจากปัจจัยการทดลอง

Source	SS	df	MS	F Value	Prob > F	
Block	99.18	2	49.59			
Model	450.90	4	112.73	39.78	< 0.0001	significant
A-glycerol	386.69	1	386.69	136.45	< 0.0001	
B-maltitol	1.01	1	1.01	0.36	0.5551	
A^2	59.36	1	59.36	20.95	0.0001	
B^2	17.13	1	17.13	6.04	0.0209	
Residual	73.68	26	2.83			
Lack of Fit	39.63	20	1.98	0.35	0.9648	not significant
Pure Error	34.05	6	5.67			
Cor Total	623.77	32				

Std. Dev.	1.68	R-Squared	0.86	C.V. %	5.08	Pred R-Squared	0.78
Mean	33.11	Adj R-Squared	0.84	PRESS	112.80	Adeq Precision	19.97

จ.2 ผลของมอลโตเดกซ์ตรินและมอลติตอลต่อค่าอัตราส่วน A620/A370 หลังการทำแห้งแบบพ่นฝอย

ตารางที่ จ.4 ปัจจัยและระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง

Factor Name	Low Actual	High Actual	Mean	Std. Dev.
Maltodextrin	2	6	4	1.71
Maltitol	0.5	1.5	1	0.43

ตารางที่ จ.5 ผลตอบสนองจากการทดลอง

Response Name	Obs	Min	Max	Mean	Std. Dev.	Ratio	Trans	Model
Loss of A620/A370 (%)	33	13.85	24.04	19.44	3.09	1.74	None	Linear

ตารางที่ จ.6 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลตอบสนองจากปัจจัยการทดลอง

Source	SS	df	MS	F Value	Prob > F
Block	60.36	2	30.18		
Model	132.71	2	66.35	16.52	< 0.0001
A-Maltodextrin	116.94	1	116.94	29.11	< 0.0001
B-Maltitol	15.77	1	15.77	3.92	0.0575
Residual	112.49	28	4.02		
Lack of Fit	96.54	22	4.39	1.65	0.2771
Pure Error	15.95	6	2.66		
Cor Total	305.56	32			

Std. Dev.	2.00	R-Squared	0.54	C.V. %	10.31	Pred R-Squared	0.37
Mean	19.44	Adj R-Squared	0.51	PRESS	153.63	Adeq Precision	12.22

ง.3 ผลของมอลโตเดกซ์ตรินและมอลติตอลต่อค่าอัตราส่วน A620/A370 หลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งระเหิดแห้ง

ตารางที่ ง.7 ปัจจัยและระดับของปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง

Factor Name	Low Actual	High Actual	Mean	Std. Dev.
Maltodextrin	2	6	4	1.71
Maltitol	0.5	1.5	1	0.43

ตารางที่ ง.8 ผลตอบสนองจากการทดลอง

Response Name	Obs	Min	Max	Mean	Std. Dev.	Ratio	Trans	Model
loss of								
A620/A370 (%)	33	2.67	52.35	25.60	14.91	19.58	None	RQuad

ตารางที่ ง.9 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลตอบสนองจากปัจจัยการทดลอง

Source	SS	df	MS	F Value	Prob > F	
Block	49.07	2	24.53			
Model	6792.07	3	2264.02	225.16	< 0.0001	significant
A-Maltodextrin	6538.88	1	6538.88	650.29	< 0.0001	
B-Maltitol	116.94	1	116.94	11.63	0.0021	
A ²	136.25	1	136.25	13.55	0.0010	
Residual	271.49	27	10.06			
Lack of Fit	238.44	21	11.35	2.06	0.1881	not significant
Pure Error	33.06	6	5.51			
Cor Total	7112.63	32				

Std. Dev.	3.17	R-Squared	0.96	C.V. %	12.39	Pred R-Squared	0.94
Mean	25.60	Adj R-Squared	0.96	PRESS	407.61	Adeq Precision	36.49

ง.4 ผลของมอลโตเดกซ์ตรินและมอลติตอลต่อค่าอัตราส่วน A620/A370 หลังการทำแห้งแบบฟั่น ฝอยและแบบแช่เยือกแข็งระเหิดแห้ง

ตารางที่ ง.10 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนของผลตอบสนองจากปัจจัยการทดลอง

Source	DF	SS	MS	F	P
method	1	879.76	879.761	549.37	0.0000
stabilizer	2	270.01	135.004	84.30	0.0000
method*stabilize	2	384.82	192.409	120.15	0.0000
Error	12	19.22	1.601		
Total	17	1553.80			

Grand Mean 15.146 CV 8.36

ตารางที่ ง.11 ผลการเปรียบเทียบชุดการทดลองโดยปัจจัย Method ด้วยวิธี Tukey HSD

Method	Mean	Homogeneous Groups
SD	22.14	A
FD	8.15	B

Alpha 0.05, Standard Error for Comparison 0.5965, Critical Q Value 3.083

Critical Value for Comparison 1.3005, Error term used: Error, 12 DF

ตารางที่ ง.12 ผลการเปรียบเทียบชุดการทดลองโดยปัจจัย Stabilizer ด้วยวิธี Tukey HSD

Stabilizer	Mean	Homogeneous Groups
Control	18.52	A
Maltodextrin	17.20	A
Maltitol	9.72	B

Alpha 0.05, Standard Error for Comparison 0.7306, Critical Q Value 3.783

Critical Value for Comparison 1.9545, Error term used: Error, 12 DF

ตารางที่ ๑.13 ผลการเปรียบเทียบชุดการทดลองโดยปัจจัย Method และ Stabilizer ด้วยวิธี Tukey

HSD			
Method	Stabilizer	Mean	Homogeneous Groups
SD	Control	31.54	A
SD	Maltodextrin	18.98	B
SD	Maltitol	15.89	BC
FD	Maltodextrin	15.41	C
FD	Control	5.50	D
FD	Maltitol	3.56	D

Alpha 0.05, Standard Error for Comparison 1.0332, Critical Q Value 4.751

Critical Value for Comparison 3.4710, Error term used: Error, 12 DF

ภาคผนวก จ

วิธีคำนวณสมการอัตราของการเปลี่ยนแปลงค่า A620/A370
ของไฟโคไซยานินเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 35 และ 45 องศาเซลเซียส

จ.1 การหาสมการอัตราของการเปลี่ยนแปลงค่า A620/A370

จากการทดสอบสมการพบว่า การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีรูปแบบการการเปลี่ยนแปลงเป็นปฏิกิริยาอันดับ 1 ซึ่งเขียนเป็นสมการเส้นตรงได้ดังนี้

$$kt = \ln(R/R_0)$$

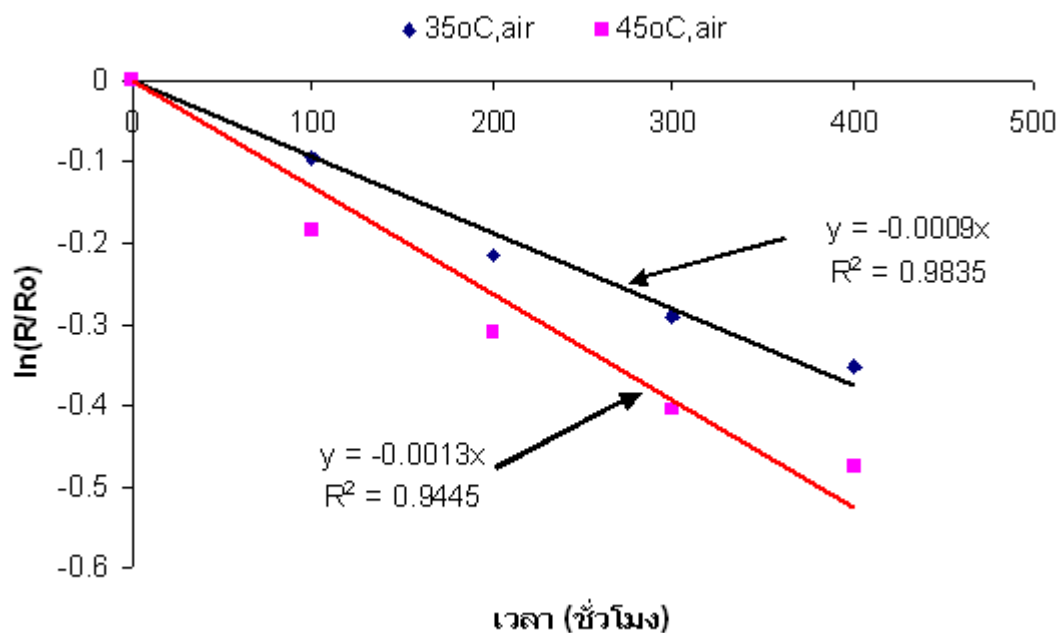
เมื่อ R คือค่าอัตราส่วน A620/A370 ที่เวลาใดๆ

R_0 คือค่าอัตราส่วน A620/A370 เริ่มต้น

t คือเวลา หน่วยเป็นชั่วโมง

k คือค่าคงที่อัตรา (Rate constant)

จากข้อมูลการเปลี่ยนแปลงค่า A620/A370 เมื่อนำมาคำนวณด้วยสมการข้างต้นแล้วนำค่า $\ln(R/R_0)$ ที่เวลาใดๆ ไปสร้างกราฟร่วมกับค่า t จะได้กราฟดังนี้



จ.2 คำนวณค่า Q_{10}

จากสมการเส้นตรงบนกราฟจะบอกค่าคงที่อัตรา ซึ่งสามารถนำมาคำนวณค่าอัตราส่วนของค่าคงที่อัตราเมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนไป 10 องศาเซลเซียส หรือ Q_{10} ได้ดังนี้

$$\begin{aligned} Q_{10} &= k_{T+10}/k_T \\ &= -13 \times 10^{-4} / -9 \times 10^{-4} \\ &= 1.44 \text{ หน่วยต่อชั่วโมง} \end{aligned}$$

จ.3 การคำนวณหาค่าความไว (Sensitivity)

จากค่า Q_{10} ดังกล่าวสามารถคำนวณหาค่าความไวของการเปลี่ยนแปลงเมื่ออุณหภูมิเปลี่ยนไป 1 องศาเซลเซียส ได้ดังนี้

$$\text{Sensitivity} = Q_1 - 1$$

$$\ln(Q_1) = \{\ln(Q_{10})\}/10$$

เมื่อ Q_1 ค่าอัตราส่วนของค่าคงที่อัตราเมื่ออุณหภูมิต่างกัน 1 องศาเซลเซียส ดังนั้น

$$\ln(Q_1) = \{\ln(1.44)\}/10$$

$$= 0.037$$

$$Q_1 = \exp(0.037)$$

$$= 1.037$$

$$\text{Sensitivity} = Q_1 - 1$$

$$= 0.037 \text{ หรือ ร้อยละ 3.7 ต่อองศาเซลเซียส}$$

จ.4 การคำนวณค่า z

การคำนวณค่าองศาของอุณหภูมิที่เปลี่ยนไปแล้วทำให้ค่าคงที่อัตราเปลี่ยนไป 10 เท่า หรือค่า z ซึ่งนิยามจากสมการ $(k_{T+z})/(k_T) = 10$ เมื่อทราบค่า Q_1 หรือ Q_{10} สามารถคำนวณได้ดังนี้

$$z = 2.303/\ln(Q_1)$$

$$= 2.303/\ln(1.037)$$

$$= 62.6^\circ\text{C}$$

5. การคำนวณครึ่งอายุของการเปลี่ยนแปลงค่า A620/A370

จากข้อ 1 เมื่อ $C = 0.5C_0 = (0.5)(3.78)$

$$\ln(0.5C_0/C_0) = kt$$

$$t_{0.5, 35} = \ln(0.5)/k$$

$$= 770 \text{ ชั่วโมง หรือ ประมาณ 32 วัน}$$

$$t_{0.5, 45} = 533 \text{ ชั่วโมง หรือ ประมาณ 22 วัน}$$

ประวัติผู้เขียน

นายราเชนทร์ ดวงศรี เกิดเมื่อวันที่ 19 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2512 เริ่มเข้าศึกษาระดับปริญญาตรีที่ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น จังหวัดขอนแก่น สำเร็จการศึกษาเมื่อปี พ.ศ. 2535 ภายหลังสำเร็จการศึกษาได้เข้าทำงานกับบริษัทวินมารีนฟู๊ด จำกัด และบริษัทไทยวาล์วกี๊เคมมิคอล จำกัด ตามลำดับ ได้รับราชการตำแหน่งอาจารย์ในภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ วิทยาลัยครูอุบลราชธานี ในปี พ.ศ.2537 ได้ลาศึกษาต่อในระดับปริญญาโทสาขาเทคโนโลยีอาหาร สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปี พ.ศ. 2547 จนกระทั่งสำเร็จการศึกษาในปี 2552

ปัจจุบัน เป็นอาจารย์ (ข้าราชการ) ประจำสาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี (เดิม วิทยาลัยครูอุบลราชธานี)